

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Terezie Černíková

Vliv bisfenolu S na vybrané markery meiotického zrání prasečích oocytů
Bisphenol S influence on selected markers of meiotic maturation of porcine oocytes

Diplomová práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. Ing. Jaroslav Petr, DrSc.

Praha, 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného ani stejného akademického titulu.

V Praze dne 6.6.2020

Podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu panu prof. Ing. Jaroslavu Petrovi, DrSc. za jeho cenné rady a komentáře, které mě dovedly k zdárnému dokončení práce. Dále bych ráda poděkovala celému týmu laboratoře reprodukční biologie, zejména Ing. Tereze Žalmanové, Ph.D. a Ing. Šárce Prokešové za jejich pomoc při mé laboratorní práci. Poděkování patří také mé rodině a přátelům za jejich velkou podporu po celou dobu mého studia.

Abstrakt

Bisfenol A (BPA) je chemická látka, široce používaná k výrobě plastů. Přítomnost BPA v životním prostředí negativně ovlivňuje lidské zdraví z důvodu kontaminace vzduchu, pitné vody a potravin. Vzrůstající obavy z účinků BPA vedly k jeho regulacím ve výrobě a k vytvoření alternativ, mimo jiné například bisfenolu S (BPS). Avšak před uvedením BPS na trh nebyly jeho účinky řádně testovány a jeho vliv na lidskou reprodukci je zatím neznámý. Z tohoto důvodu je žádoucí testovat vliv BPS na vývoj savčích oocytů. Tato práce předpokládá hypotézu, že expozice BPS způsobuje změny v průběhu meiotického zrání prasečích oocytů *in vitro*. Cílem této práce je zkoumat vliv BPS v nízkých koncentracích, odpovídajících běžným expozicím člověka, na vybrané meiotické proteiny prasečích oocytů. Výsledky práce demonstrují negativní vliv BPS na progresi meiotického zrání a dosažení stadia zralého oocyty. Kromě toho výsledky prokazují nárůst tvorby defektních dělicích vřeten a narušení mitochondriální integrity po kultivaci v BPS. Nicméně vliv BPS na výskyt dvouvláknových zlomů DNA nebyl v této studii prokázán, jako tomu bylo v případě BPA. Souhrnně výsledky prokazují, že BPS má obdobné či větší dopady na meiotické zrání savčích oocytů a jedná se tedy o nevhodně zvolenou náhradu za BPA.

Klíčová slova: oocyt, meiotické zrání, bisfenol S, bisfenol A

Abstract

Bisphenol A is a widely used chemical in the manufacture of plastics. The presence of BPA in the environment adversely affects human health due to contamination of air, drinking water and food. Growing concerns about the effects of BPA have led to its regulation in production and development of alternative chemicals to BPA, such as bisphenol S (BPS). However, the effects of BPS were not properly tested before its introduction to production and the effects on human reproduction are still unknown. For this reason, it is desirable to test the effect of BPS on mammalian oocyte development. This study hypothesizes that BPS exposure causes inhibition of meiotic maturation of porcine oocytes in vitro. This study aims to investigate the potency of BPS at low concentrations corresponding to normal human exposures to selected porcine oocyte proteins. The results of this study demonstrate the negative effect of BPS on the progression of meiotic maturation and reaching the mature oocyte stage. In addition, the results show an increase in the formation of defective meiotic spindles and a disruption of mitochondrial integrity after exposure to BPS concentrations. However, the effect of BPS on double-strand breaks was not demonstrated in this study, in contrast to the case of BPA. Taken together, the results show that BPS has similar or greater effects on the meiotic maturation of mammalian oocytes and is, therefore, an inappropriately chosen substitute for BPA.

Keywords: oocyte, meiotic maturation, bisphenol S, bisphenol A

Obsah

1	Seznam zkratk	1
2	Úvod	3
3	Literární přehled.....	4
3.1	Oogeneze.....	4
3.1.1	Proliferace zárodečných buněk.....	4
3.1.2	Růst oocyty.....	5
3.1.3	Meiotická kompetence	9
3.1.4	Meiotické zrání.....	9
3.1.5	Regulace meiotického zrání	14
3.2	Endokrinní disruptory.....	22
3.2.1	Bisfenol A.....	23
3.2.2	Bisfenol S.....	25
4	Hypotéza a cíle práce	28
5	Materiály a metodika	29
5.1.1	Chemikálie.....	29
5.1.2	Izolace a získávání oocytů	30
5.1.3	Kultivace oocytů	30
5.1.4	Western blot	30
5.1.5	Imunocytochemie	31
5.1.6	Tunel assay	32
5.1.7	Konfokální mikroskopie a analýza obrazu.....	33
5.1.8	Statistická analýza	33
6	Výsledky.....	34
6.1	Vliv BPS na průběh meiotického zrání.....	34
6.2	Vliv BPS na utváření dělicího vřeténka v průběhu meiotického zrání.....	35
6.3	Vliv BPS na integritu mitochondrií v průběhu meiotického zrání	38
6.4	Vliv BPS na chromatinovou integritu během meiotického zrání	43
7	Diskuze	44
8	Závěr.....	52
9	Seznam použité literatury	53

1 Seznam zkratek

APC – komplex podporující anafázi (anaphase-promoting complex)
APF – faktor podporující stárnutí (aging promoting factor)
ARs – androgenní receptory (androgen receptors)
BMP-15 – kostní morfogenetický protein 15 (bone morphogenetic protein 15)
BPA – bisfenol A
BPS – bisfenol S
BSA – bovinní sérový albumin (bovine serum albumin)
Bub1 – mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase Bub1
cADPR – cyklická adenosindifosfát ribóza (cyclic ADP-ribose)
CaMKII – kalcium/kalmodulin dependentní kináza II (calmodulin-dependent protein kinase II)
cAMP – cyklický adenosin monofosfát (cyclic adenosine monophosphate)
dbcAMP – dibutyryl-cAMP
CDC25 – fosfatáza (cell division cycle 25 phosphatases)
CDK – cyklin dependentní kináza (cyclin-dependent kinase)
cGMP – cyklický guanosin monofosfát (cyclic guanosine monophosphate)
COC – kumulo-oocytární komplex (cumulus-oocyte complex)
CSF – cytostatický faktor (cytostatic factor)
DAG – 1,2-diacylglycerol
DBS – DNA dvouvláknové zlomy (DNA double-strand breaks)
DNA – deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DRP1 – dynaminu příbuzný protein 1 (dynamin-related protein 1)
E2 – estradiol
EDs – endokrinní disruptory (endocrine disruptors)
Emi 1 – inhibitor mitózy 1 (early mitotic inhibitor 1)
ERs – estrogenní receptory (estrogen receptors)
ERK – extracelulárně regulované kinazy (extracellular signal-regulated kinases)
Erp – Emi příbuzný protein (emi-related protein)
FIG- α – faktor zárodečné linie alfa (factor in the germline alpha)
FITC – fluorescein-5- izothiokyanát
FSH – folikulostimulační hormon (follicle stimulating hormone)
FZR1 – Fizzy-related protein homolog
GDF-9 – růstový diferenciační faktor 9 (growth differentiation factor 9)
GPR – receptory spojené s heterotrimerními G proteiny (G-protein coupled receptor)
GV – zárodečný váček (germinal vesicle)
GVBD – rozpad zárodečného váčku (germinal vesicle breakdown)
IGF – růstový faktor podobný insulinu (Insulin-like growth factor)
IP₃ – inositol-1,4,5-trifosfát

IP₃R – inositol-1,4,5-trifosfátové receptory
LH – luteinizační hormon (luteinizing hormone)
MI – metafáze prvního meiotického dělení (metaphase first meiotic division)
MII – metafáze druhého meiotického dělení (metaphase second meiotic division)
Mad – mitotic spindle assembly checkpoint protein Mad
MAPK – mitogeny aktivovaná protein kináza (mitogen-activated protein kinase)
MEK – mitogeny aktivovaná protein kináza kináza (mitogen-activated protein kinase kinase)
MFN1 – mitofusin I
MFN2 – mitofusin II
Mos – proto-oncogene, serine/threonine kinase
MPF – faktor podporující metafázi (metaphase promoting factor)
mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)
MTOC – mikrotubuly organizující centrum (microtubule-organizing center)
MYT 1 – membrane-associated tyrosine – and threonine-specific cdc2-inhibitory kinase
NPPC – prekursor natriuretického peptidu C (natriuretic peptide-C precursor)
NPR – receptor natriuretického peptid prekursoru-C (natriuretic peptide receptor)
NuMA – protein jaderného mitotického aparátu (nuclear mitotic apparatus protein)
OMI – inhibitor zrání oocyty (oocyte maturation inhibitor)
OPA1 – mitochondriální dynaminu podobná GTPáza (mitochondrial dynamin like GTPase)
PCNT – pericentrin
PDE – fosfodiesteráza (phosphodiesterase)
PGCs – primordiální zárodečné buňky (primordial germ cells)
PKA – proteinkináza A (protein kinase A)
PLC – fosfolipáza C (phospholipase C)
Plk – polo-like kináza (polo like kinase)
RNA – ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
ROS – reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
rsk – ribozomální s6 kinázy (ribosomal s6 kinases)
RyRs – ryanodinové receptory (ryanodine receptors)
TGF-β1 – transformační růstový faktor beta (transforming grow factor beta)
TRs – thyroidní receptory (thyroid receptors)
Wee 1 – wee1-like protein kinase
ZP – *zona pellucida*

2 Úvod

Výskyt velkého množství toxických chemikálií v životním prostředí různým způsobem negativně ovlivňuje organismus savců včetně reprodukčních funkcí. Četnost studií poukazujících na spojitost mezi snižující se plodností mužů a žen s ohledem na masivní expozice exogenním chemikáliím indikuje závažnost problému z pozice reprodukční medicíny. Do skupiny environmentálních polutantů patří endokrinní disruptory (EDs) narušující rovnováhu fyziologických funkcí organismu zvířat a lidí na úrovni hormonální regulace. Jedním z nejznámějších EDs je bisfenol A (BPA), který patří mezi celosvětově nejvíce produkované chemikálie pro výrobu plastových polymerů. Pod tlakem vzrůstajícího počtu studií potvrzujících negativní účinky BPA na organismus člověka bylo významně omezeno jeho využití ve výrobě konzumního zboží a tím vznikly zvýšené požadavky na vytvoření alternativní náhrady. Nejběžnější náhradou za BPA je jeho strukturní analog bisfenol S (BPS). BPS je prokazatelně hůře degradovatelný než BPA a neměl by se uvolňovat z polymerů do prostředí v takové míře. Nicméně jeho endokrinní účinky a schopnost imitovat hormon estradiol byly již potvrzeny několika studiemi. Průmyslová produkce BPS v současné době nepodléhá žádným regulacím. Řada studií již potvrdila negativní vliv BPS na fyziologii člověka. Výsledky současných výzkumů naznačují, že se jedná o „politováníhodnou náhradu“.

Vliv EDs na hormonální rovnováhu má za následek změny v endokrinní regulaci reprodukční soustavy. EDs mohou tak ženskou reprodukční soustavu narušovat na několika úrovních, např. v průběhu folikulogeneze, meiotického zrání oocytů, a vlastní schopnosti implantace a vývoje životaschopného embrya. Bezchybný průběh meiotického zrání vede k produkci zralých oocytů a je tím pádem zásadním procesem pro ženskou plodnost. V současnosti existuje mnoho studií potvrzujících negativní dopad BPA na savčí oogenezi. V případě BPS bylo publikováno několik studií zabývajících se tématem vlivu BPS na vývoj savčích oocytů. Výzkumy zabývající se dopadem na lidské oocyty dosud chybí. Otázkou je, zda BPS s analogickou strukturou k BPA a estrogenní aktivitou, disponuje analogickými negativními účinky, jako má BPA na klíčové proteiny meiotického zrání savčích oocytů.

3 Literární přehled

3.1 Oogeneze

Oogeneze je proces, během kterého dochází k vývoji oocytů z malého množství primordiálních zárodečných buněk do zralého oocyty schopného oplození. Důležitým krokem v průběhu oogeneze je redukce počtu chromozomů oocyty na polovinu, což je uskutečněno v průběhu redukčního dělení – meiózy. U savců začíná oogeneze již velice brzy během raného embryonálního vývoje samice a končí se ztrátou její pohlavní aktivity. Celý proces zahrnuje tři klíčové fáze: proliferaci, růst a zrání oocytů.

3.1.1 Proliferace zárodečných buněk

Oogeneze začíná tvorbou primordiálních zárodečných buněk (PGCs) během gastrulace. U savců vznikají prekursori PGCs přibližně 6. den embryonálního vývoje. PGCs se diferencují z buněk epiblastu embrya. Následně migrují při utváření primitivního proužku do epitelu zadního střeva (entodermální původ) a zastaví se v genitálních lištách (mezodermální původ), které se později přemění v pohlavní gonády (Pepling, 2006). Přežití a migrace PGCs závisí na řadě faktorů, např.: na lokální produkci cytokinů, transformačním růstovém faktoru $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) (Chuva de Sousa Lopes et al., 2005) a produkci c-kit ligandu (Hutt et al., 2006) somatickými buňkami v místech migrace PGCs (Farini et al., 2007). Ve chvíli, kdy PGCs doputují do míst vzniku budoucích pohlavních gonád, ztrácejí svoji schopnost motility a diferencují se na oogonie. Oogonie se dále mitoticky dělí a zvětšují tak několikanásobně svojí populaci (Picton et al., 1998). Mitotické dělení můžeme u prasat sledovat již od 13. dne zárodečného vývoje do 7. dne po narození plodu. Během tohoto období se počet zárodečných buněk u prasat zvýší z 500 na 1 100 000, kdy dosahuje svého vrcholu (Black a Erickson, 1968). Před vstupem do meiózy probíhá replikace DNA, která je rovněž poslední až do oplození oocyty.

Oogonie jsou v pohlavních lištách seskupeny do shluků se somatickými buňkami. Spolu jsou propojeny mezibuněčnými cytoplasmatickými můstky. Později dojde k přerušení těchto můstků a k obklopení primárních oocytů jednovrstevným epitelem somatických buněk tvořícím tzv. primordiální folikul (Pepling a Spradling, 2001). Interakce mezi

oocyty a somatickými buňkami je regulována transkripčním faktorem FIG- α (factor in the germline alpha). FIG- α je zásadním faktorem pro začátek folikulogeneze, vycházíme-li z toho, že u myši s chybějícím genem pro FIG- α nedocházelo k formaci primordiálních folikulů (Soyal et al., 2000). Během procesu formace primordiálních folikulů podlehnou velké množství oocytů apoptóze (Baker, 1963; Vaskivuo et al., 2001). Dle dogmatu reprodukční biologie určuje množství primordiálních folikulů po narození konečný oocytární rezervoár ženy pro celý její budoucí reprodukční život (Kezele et al. 2002). Ovšem několik studií poukázalo na existenci potencionálního zdroje kmenových buněk ve vaječnících, které jsou schopné se diferencovat do oocytů i během postnatálního života (Bukovsky et al. 2004; Johnson et al. 2004).

Na začátku prvního meiotického dělení vstupuje oogonie do profáze I. Nejdříve dochází ke kondenzaci chromatinu tvořícího kompaktní chromozomy, párování homologních chromozomů v bivalenty a vzniku překřížení mezi nesesterskými chromatidami tzv. *crossing-over*. V pozdní profázi I se rekombinované chromozomy oddalují, zůstávají však spojeny v místech *crossing-overu*. Na konci profáze I se meiotické dělení oocyty zastaví, v tzv. prvním meiotickém bloku a setrvá takto až do doby spuštění prvního pohlavního cyklu. Meiotický blok trvá v závislosti na živočišném druhu týdnů u myši až desetiletí u lidí. Oocyt se v této fázi nazývá primárním oocytem (Picton et al., 1998).

3.1.2 Růst oocyty

Jako počátek růstové fáze je obvykle označován okamžik, kdy oogonie vstupuje do prvního meiotického dělení a zastaví se v profázi I, viz. výše. V průběhu růstu oocyty dochází k rozsáhlým změnám v cytoplasmě, masivní genové expresi, produkci nových organel a přeměně nebo distribuci organel stávajících. V rostoucích oocytech byla zaznamenána vysoká transkripční aktivita a s tím související nárůst RNA syntézy. Zvýšená syntéza RNA, ale také vyšší příjem makromolekul, slouží v oocyty ke dvěma účelům. V první řadě k samotnému růstu a vývoji oocyty a v druhé řadě k uskladnění RNA/proteinů potřebných pro vývoj raného embrya po oplození. Rané embryo je transkripčně neaktivní a tím pádem zcela závislé na maternálních zásobách až do aktivace embryonálního genomu (Kanitz et al., 2001). Jedním z příkladů uskladněné maternální mRNA je transkript kódující protein Oct-3 (octamer-binding transcription

factor 3), tj. transkripční faktor esenciální pro první embryonální dělení (Rosner et al. 1991). Většina uskladněných mRNA je translatována v obdobích vývoje oocyty či raného embryonálního vývoje, kdy je stupeň transkripce nízký či žádný. K regulaci jejich uchování slouží ve většině případů polyadenylace/deadenylace konců mRNA. Přítomnost polyadenylace poly A konce s více jak 150 adeninovými nukleotidy na transkriptu zvyšuje jeho stabilitu v cytoplasmě a podněcuje k iniciaci translace. Naopak mRNA s kratšími poly A konci (15-90 adeninový nukleotidů) je méně stabilní a tlumí tak svojí translaci. Takovéto transkripty jsou předurčené k uskladnění. (Bachvarova 1992; Wang et al. 2004). Předčasná translaci nebo degradaci mRNA lze předejít také díky asociaci se specializovanými ribonukleovými proteiny, které obalí mRNA a zabrání tím asociaci s ribozomy (Schultz et al. 1983; Eichenlaub-Ritter a Peschke 2002). Dalším způsobem, jak regulovat translaci, je začlenění mRNA do RNA granul. RNA granula regulují například načasování translace mRNA cyklinu B, jehož funkce je důležitá k znovuzahájení meiózy. Ve studii provedené na myších oocytech bylo zjištěno, že k vytvoření RNA granul pomáhají aktinová vlákna a protein Pum1 (pumilio homolog 1), který se váže přímo na transkripty cyklinu B a zabraňuje tak translaci (Kotani et al. 2013).

V růstové fázi se průměr prasečího oocyty zvětší z 30 μm na 120 μm (Motlík a Fulka 1986). Zvýšená akumulace RNA v jádře má za následek jeho dramatický nárůst. Jadérko je v této fázi kompaktní a snadno viditelné. Jádro oocyty označujeme v růstové fázi jako zárodečný váček (GV). Chromatin kolem jadérka utváří tvar prstence či podkovy (Zuccotti et al. 1995; Tan et al. 2009).

Většina organel je v malých oocytech uspořádána kolem jádra a tvoří tzv. Balbianiho tělísko, které postupně mizí s růstem oocyty a migrací organel ke kortexu buňky (Gosden et al. 1997). K periférii plazmatické membrány migruje například Golgiho aparát, který se diferencuje do členitého komplexu plochých cisteren a váčků. Golgiho aparát se na periférii podílí na exportu glykoproteinů důležitých pro vytvoření vrstvy *zona pellucida* (ZP). Endoplasmatické retikulum se také přesouvá k periférii oocyty, pravděpodobně za účelem uvolnění velkého množství vápníku důležitého pro exocytózu kortikálních granul po oplození. Kortikální granula jsou specializované váčky naplněné enzymy a hrají důležitou roli při vytvoření bloku proti polyspermii po oplození (Mehlmann et al. 1995). Centrioly jsou obecně přítomny na začátku oogeneze

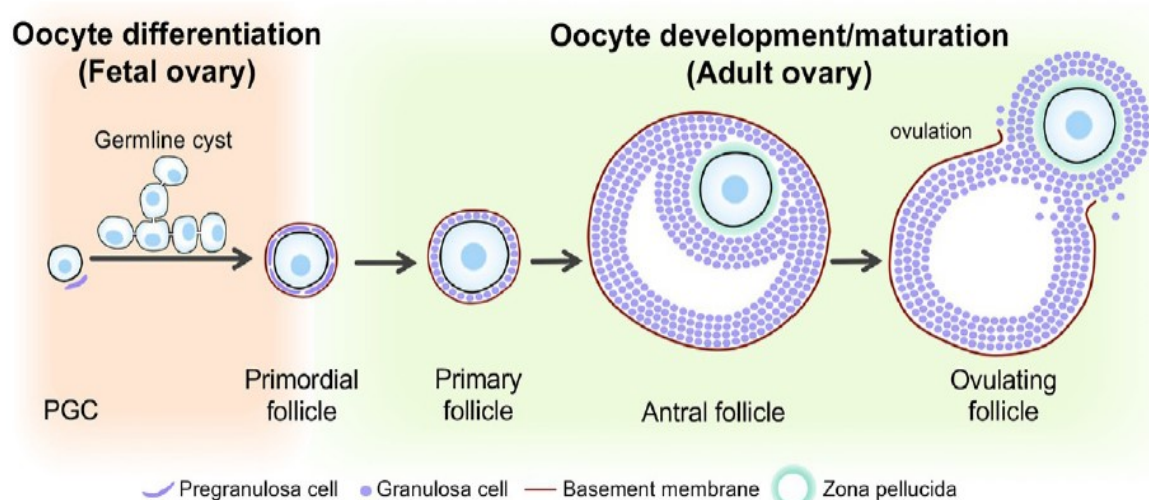
v oogoniích, později v průběhu zrání oocyty však dojde k jejich vymizení. Získané jsou poté ze spermií při oplození (Szollosi et al., 1972; Sathananthan et al. 2006).

Ve fázi růstu dochází k vytvoření glykoproteinového obalu ZP, která se skládá ze tří typů zonálních proteinů 1 (ZP1), 2 (ZP2), 3 (ZP3), u většiny živočišných druhů. U lidských oocytů můžeme nalézt i zonální protein 4 (ZP4), který dohromady s ostatními typy glykoproteinů tvoří ochranný obal o tloušťce 15 μm (Cohen et al., 1992). Transkripčním faktorem nutným pro expresi genů pro glykoproteiny ZP je FIG- α (Soyal et al., 2000). Z hlediska struktury hrají glykoproteiny ZP1, ZP2, ZP3 různé role. Matrix ZP je složen z dlouhých filament sestavených ze ZP2-ZP3 dimerů, jejichž pojícím článkem jsou ZP1 dimery. Hlavní funkcí ZP3 je spuštění akrozomální reakce po navázání spermiie na ligand glykoproteinu (Kongmanas et al. 2015).

3.1.2.1 Vývoj folikulu

Růst oocyty a folikulu jsou dva propojené procesy tvořící jeden funkční celek. Zpočátku je jejich růst paralelní. Avšak na konci růstové fáze dosáhne oocyt svého maximálního průměru a jeho růst se zastaví, na rozdíl od folikulu, jehož průměr se dále zvětšuje. První stadium vývoje folikulu je primordiální folikul s jednou vrstvou pregranulozních buněk (viz výše). Přeměnou plochých buněk na buňky kubického tvaru vzniká folikul primární. Intenzivní proliferací buněk se vytváří sekundární folikul, neboli preantrální, obklopený více jak jednou vrstvou granulózních buněk (Eppig, 2001). Vrstvu granulózních buněk sekundárního folikulu začínají obalovat buňky thekální (*theca folliculi interna a externa*), kterými postupně prorůstají krevní kapiláry. Od této chvíle začíná být folikul citlivý na gonadotropiny a buňky *theca interna* exprimují receptory pro luteinizační hormon (LH). V granulózních buňkách se utvářejí receptory pro folikulostimulační hormon (FSH) vylučovaný z hypofýzy (Hyttel et al., 2008). Pod vlivem LH začnou buňky *theca interna* tvořit androgeny, které jsou v granulózních buňkách přeměněny enzymem aromatázou na estrogeny. Estrogeny poté spolu s FSH stimulují granulózní buňky k proliferaci a tvorbě sekretů. To má za následek vytvoření *antra* – dutiny a vzniku Graafova folikulu, neboli antrálního folikulu (Obr. 1). V Graafově folikulu se již oocyt nenachází ve středu, ale na tzv. vejconosném hrbolku - *cumulus oophorus* (Polan et al., 1984). Granulózní buňky se tak diferencují na kumulární, které jsou v bezprostředním kontaktu s oocytem,

a murální buňky lemující stěnu antra (Eppig, 2001). Kumulární buňky jsou propojeny s oocytem pomocí mezibuněčných spojů – gap junctions. Vytvořenou strukturu nazýváme kumulo-oocytární komplex (COC) (Anderson a Albertini 1976; Eppig 2018). Vývoj folikulu je pod komplexní regulací cytokinů a hormonů. Proteiny rodiny TGF- β podporují zejména vývoj raných folikulů. Do této rodiny proteinů spadá např. GDF-9 (growth differentiation factor 9) a BMP-15 (bone morphogenetic protein 15). Oba jsou exprimovány oocytem, jenž se tak přímo podílí na diferenciaci folikulu. GDF-9 je syntetizován v oocytech od stadia primárního folikulu až do stadia Graafova folikulu (Günesdogan a Surani, 2016). V souladu s tím Dong et al. (1996) potvrzuje sterilitu myších samic s knock-outem genu pro GDF-9 právě z důvodů zastavení vývoje primárních folikulů. Kumulární buňky ovlivňují vývoj oocytu prostřednictvím růstových faktorů, živin (pyruvát), metabolických prekurzorů atd. Kromě toho procházejí díky gap junctions faktory udržující oocyty v meiotickém bloku, např. cAMP (Shimada a Terada 2002), nebo cGMP (Norris et al. 2009). Oocyty oproti tomu ovlivňují proliferaci a diferenciaci granulózních buněk (Picton et al., 1998).



Obrázek. 1: Proces folikulogeneze savců. Schéma znázorňuje vznik primordiálního folikulu během fetálního a postnatálního vývoje. Následně vzniká primární folikul s oocytem obklopeným jednou vrstvou granulózních buněk. Vlivem stimulace gonadotropinu dochází k vytvoření dutiny vyplněné folikulární tekutinou. Folikul je označován jako antrální. Posledním stadiem vývoje je ovulační folikul. Převzato z Ikami et al. (2017)

3.1.3 Meiotická kompetence

Meiotickou kompetenci definujeme jako schopnost oocyty obnovit meiózu a dokončit fázi zrání. Existuje několik modelů pro hodnocení meiotické kompetence oocyty. Nejběžnějším je měření velikosti folikulu a oocyty samotného. Oocyty z větších folikulů jsou obecně považovány za meioticky kompetentní, na rozdíl od oocytů z menších folikulů, jelikož se předpokládá, že měly více času ve fázi růstu a nahromadily tím potřebné proteiny pro další fáze vývoje (Pavlok et al., 1992; Lonergan et al., 1994; Marchal et al., 2002). Výzkumná skupina Motlik et al. (1984) rozdělila prasečí oocyty dle jejich vývojové kompetence do tří skupin. Plně meioticky kompetentní oocyty jsou schopny znovu zahájit meiózu a dokončit meiotické zrání. Dosahují velikosti 120 μm . Částečně kompetentní oocyty dokáží znovu zahájit meiotické zrání, ale nejsou schopny ho dokončit a jejich vývoj se zastaví již ve stádiu první meiotické metafáze. Jejich velikost se pohybuje mezi 100 a 110 μm . Za meioticky nekompetentní oocyty jsou označovány oocyty dosahující velikosti do 99 μm (Motlik et al., 1984b; Hunter et al., 2002).

Výzkumná skupina Marchal et al. (2002) analyzovala vliv velikosti folikulu na kompetenci oocyty. Folikuly menší než 3 mm klasifikovali jako malé, střední o velikosti 3-5 mm a velké folikuly nad 5 mm. COCs zrály po dobu 44 hodin v *in vitro* podmínkách. Výsledky studie potvrdily větší schopnost dokončit meiózu u oocytů pocházejících ze středních nebo velkých folikulů než u oocytů z malých folikulů (Marchal et al., 2002). Výzkum Fair et al. (1995) potvrdil pozitivní korelaci mezi velikostí folikulů a velikostí oocytů krav, avšak přítomnost plně dorostlých oocytů byla zaznamenána částečně také v malých folikulech. Z tohoto důvodu nelze považovat velikost folikulu za zcela spolehlivý ukazatel kvality oocyty na rozdíl od velikosti oocyty samotného. Existuje ještě několik alternativních modelů, podle kterých je možné posuzovat kvalitu oocytů, např. rozmístění kortikálních granul, lipidových kapének a neméně důležitá je redistribuce mitochondrií (Reader et al., 2017).

3.1.4 Meiotické zrání

Pro úspěšný průběh meiotického zrání oocytů je důležitá vzájemná interakce mezi kumulárními buňkami, cytoplazmou a jádrem oocyty. Meiotické zrání dělíme na dva

procesy: jaderné a cytoplasmatické zrání, které ovšem probíhají současně a vzájemně se ovlivňují. Jaderné zrání je charakterizováno znovuzahájením meiózy a přeměnou primárního oocyty s jádrem ve stadiu GV v sekundární oocyt ve stadiu druhé meiotické metafáze. Cytoplasmatické zrání zahrnuje molekulární a strukturní změny v cytoplasmě, které započaly již v průběhu růstu oocyty a pokračují během maturace. (Ferreira et al., 2009).

3.1.4.1 Jaderné zrání

Plně dorostlý oocyt ve stadiu GV je meioticky kompetentní a schopný podstoupit proces označovaný jako rozpad zárodečného váčku (GVBD). Proces GVBD v oocytech prasete dělíme podle všeobecně přijímaných kritérií stanovených Motlíkem a Fulkou (1976) do 4 fází. Ve fázi GV1 je jaderná membrána a jadérko zřetelně viditelné, chromatin se začíná kondenzovat a tvoří tvar prstence nebo podkovy kolem jadérka. Dále ve fázi GV2 můžeme pozorovat shluky chromatinu na jaderné membráně, ale chromatinový prstenec kolem jadérka je stále viditelný. Pro fázi GV3 je charakteristické úplné rozpadnutí prstencovité struktury a vytvoření filamentární sítě rozprostřené po jádře. Ve fázi GV4 nelze již jadérko rozeznat a dochází k GVBD (Motlík a Fulka, 1976; Lucas et al., 2002; Tan et al., 2009). Na začátku GVBD jsou fosforylovány lamíny na vnitřní stěně jaderné membrány. Následně se jaderná membrána rozpadne do váčků propojených s endoplasmatickým retikulem. Váčky jsou později použity na opětovné vystavění jaderné membrány po oplození oocyty (Lucas et al., 2002).

Zároveň s GVBD probíhá tvorba mikrotubul – organizujících center (MTOCs) kolem kondenzovaných chromozomů. Klíčovou komponentou pro vytvoření a udržení stability acentrozomálních MTOCs v savčích oocytech je pericentrin (PCNT) (Schuh a Ellenberg, 2007). V metafázi I a II je PCNT lokalizován s γ -tubulinem na pólech meiotického vřetena tvořící s dalšími proteiny pericentronální matrix (Ma a Viveiros, 2014). Primární funkcí γ -tubulinu je především nukleace mikrotubulů směrem od mínus konce v MTOCs k chromozomům. Z MTOCs vychází mikrotubuly náhodnými směry a dochází k napojení na kinetochory chromozomů. Dalším proteinem podílejícím se na formaci vřetene je NuMA (nuclear mitotic apparatus protein). NuMa je propojen s dyneinovým komplexem a nachází se v místě napojení mikrotubulů na chromozomy (Merdes et al., 1996).

S postupujícím dělením se NuMA pohybuje od kondenzovaných chromozomů podél mikrotubulů směrem k mínus konci a v metafázi se již NuMa vyskytuje na obou pólech dělicího vřetena (Kim et al., 1998; Schuh a Ellenberg, 2007). Důležitým krokem je bi-polarizace navázaných mikrotubulů a vytvoření bipolárního vřeténka, přičemž u lidských a prasečích oocytů to trvá přibližně 6 hodin (Holubcova et al., 2015). Konečná formace dělicího vřeténka připomíná u většiny savčích oocytů tvar sudu (Lee et al., 2000; Li et al., 2005).

Hustá síť aktinových vláken se v oocytech ve fázi GV nachází pod oolemou a kolem GV. Ve chvíli, kdy je dělicí vřeteno bi-polarizované, probíhá jeho posun po mikrofilamentech ke kortexu buňky. V metafázi I můžeme pozorovat koncentrovanou síť aktinových vláken v těsné blízkosti chromatinu, což napomáhá při vydělení polárního tělíska (Kim et al., 1998). Prasečí oocyty kultivované s cytochalasinem B, inhibitorem polymerace aktinových vláken, zastavily svůj vývoj v metafázi I. Výsledek dokazuje důležitou roli mikrofilament při vydělení polárního tělíska a progresi vývoje oocytu (Wang et al., 2000; Sun et al., 2001b).

Signálem pro obnovení meiózy je vlna LH předcházející ovulaci *in vivo* nebo vyjmutí z folikulu v případě *in vitro* zrání. LH vlna přispívá k eliminaci inhibitorů zrání (OMI) a aktivuje faktory ovlivňující jaderné zrání (Hunter, 2002). První meiotické dělení pokračuje po profázi I do metafáze I. Páry homologních chromozomů se seřazují do ekvatoriální roviny. Poté dochází k rozdělení homologních chromozomů a jejich posunu k pólům buňky v anafázi I. Tímto se redukuje počet chromozomů na polovinu. V telofázi I proběhne dělení buňky a vydělení prvního pólového tělíska s polovinou genetického materiálu a několika málo organelami (Eichenlaub-Ritter, 2012). Druhé meiotické dělení pokračuje hned po meióze I bez replikace DNA (Kishimoto, 2003). Vytvoří se druhé dělicí vřeténko, které je obvykle menší než vřeteno prvního meiotického dělení. Chromozomy se v metafázi II seřadí do ekvatoriální roviny. Zde se dělení opět zastaví a nastává tzv. II. meiotický blok. V II. meiotickém bloku zůstává oocyt u většiny savců, než dojde k oplození nebo partenogenetické aktivaci (Gardner a Evans, 2005). Fúze plazmatických membrán spermie a oocytu spouští znovuoobnovení meiózy, která je dokončena vydělením druhého pólového tělíska (Sun a Nagai, 2003).

3.1.4.2 Cytoplasmatické zrání

Ultrastrukturální analýzy prokázaly, že mitochondrie, ribozomy, kortikální granula, endoplasmatické retikulum a Golgiho aparát zaujímají různé rozmístění v oocytu během přechodu z GV stadia do stadia metafáze II. Nejen správná segregace chromozomů během jaderného zrání, ale také redistribuce organel, hromadění mRNA, proteinů a transkripčních faktorů ovlivňují vývojovou kompetenci oocytu. Vývojová kompetence oocytu zahrnuje schopnost oocytu dokončit meiózu, ale také podstoupit úspěšné oplození a následný vývoj zdravého embrya (Ferreira et al., 2009). Jedny z nejdůležitějších organel pro průběh meiotického zrání z hlediska přísunu energie jsou mitochondrie.

Mitochondrie mají schopnost přizpůsobit svůj tvar a velikost v reakci na metabolický nebo enviromentální stres. Jejich fúze umožňuje spojit obsah dvou mitochondrií a zmírnit tak případné dysfunkce spojené se stresem (Youle a van der Bliek, 2012). Mitofusin I (MFN1) a mitofusin II (MFN2) jsou GTPázy zabudované do vnější mitochondriální membrány. Jejich funkce je nezbytná pro mitochondriální fúzi. Kromě MFNs reguluje fúzi mitochondrií protein OPA1 (mitochondrial dynamin like GTPase) zabudovaný ve vnitřní membráně. Protein zodpovědný za štěpení mitochondrií je DRP1 (dynamin-related protein 1) (Cipolat et al., 2004). MFNs se nepodílejí pouze na mitochondriální fúzi, ale také na regulaci elektronového transportního řetězce a mitochondriálního membránového potenciálu (Schneeberger et al., 2013). Studie na myších fibroblastech objevily lokalizaci MFN2 na rozhraní mitochondrií a endoplasmatického retikula, kde je jeho funkcí propojení obou organel (de Brito a Scorrano, 2008).

Aktivita a reorganizace mitochondrií patří ke klíčovým událostem během cytoplasmatického zrání. Mnoho studií spojuje změnu distribuce mitochondrií během zrání s vývojovou kompetencí oocytu. Změny v distribuci mitochondrií a jejich aktivita byly měřeny u různých živočišných druhů včetně myší (Van Blerkom a Runner 1984; Calarco, 1995), krav (Stojkovic et al., 2001), prasat (Sun et al., 2001; Brevini et al., 2005) a lidí (Wilding et al., 2001). Změny v lokalizaci mitochondrií byly prokázány u myší, kde se mitochondrie koncentrují v blízkosti kondenzujících chromozomů na začátku zrání a poté se přemísťují společně s dělicím vřeténkem k periferii oocytu. V nejnovějších

studiích na prasečích oocytech vykazují oocyty rozmístění mitochondrií převážně na periférii a kolem GV. S nástupem fáze zrání se přemísťují do středu oocytu a u zralých oocytů je rozložení mitochondrií převážně subkortikální. Tento model distribuce mitochondrií nebyl zaznamenán u oocytů s nízkou vývojovou kompetencí, kde mitochondrie zůstávaly jen u kortexu buňky (Pawlak et al., 2012; Cui et al., 2019). Stejná korelace mezi pohybem mitochondrií a vývojovou kompetencí byla pozorována i ve studii na oocytech krav (Stojkovic et al., 2001). Subkortikální distribuce mitochondrií charakteristická pro zralé oocyty není již patrná po oplození u zygot, kde dochází ke shromáždění mitochondrií v oblasti prvojádra. Důvodem je pravděpodobně větší potřeba ATP pro následnou mitózu. Stejný jev byl prokázán u myši (Tokura et al., 1993) a lidí (Van Blerkom et al., 2000).

Zdroj energie ve formě ATP je rozhodující pro zrání oocytů, oplození a následný vývoj embryí (Van Blerkom and Davis, 2007). Zvýšená oxidační aktivita mitochondrií byla zaznamenána během zrání prasečích oocytů *in vivo* (Torner et al., 2004b). Absence nárůstu membránového potenciálu během fáze zrání byla spojena se sníženým vývojovým potenciálem u myších oocytů (Acton et al., 2004).

Z hlediska vývojové kompetence byla zkoumaná spojitost s počtem kopií mitochondriální DNA (mtDNA). Výsledky se mezi studiemi liší, pravděpodobně z důvodu použití rozdílných technologií. Studie pracující s bovinními a prasečími oocyty prokázaly nárůst mtDNA kopií ke konci fáze zrání (Iwata et al., 2011; Pawlak et al., 2012). Naproti tomu Barritt et al. (2002) nezaznamenali v lidských oocytech korelaci mezi počtem mtDNA na začátku a na konci fáze zrání. Dalším možným faktorem ovlivňujícím počet mitochondrií je věk. Signifikantně méně kopií mtDNA bylo nalezeno v oocytech žen starších 40 let, v porovnání s pokusnou skupinou oocytů mladších žen (Murakoshi et al., 2013). Je známo, že s průběhem oogeneze narůstá počet mitochondrií podle vývojového stadia oocytu. V zárodečných buňkách se počet mitochondrií pohybuje kolem 10ti, v oogoniích již kolem 200. Primární oocyty obsahují přibližně 6000 a během zrání se počet zvyšuje na cca 100 000 mitochondrií s jednou kopií mtDNA u prasat (Trimarchi et al., 2000; Tarazona et al., 2006).

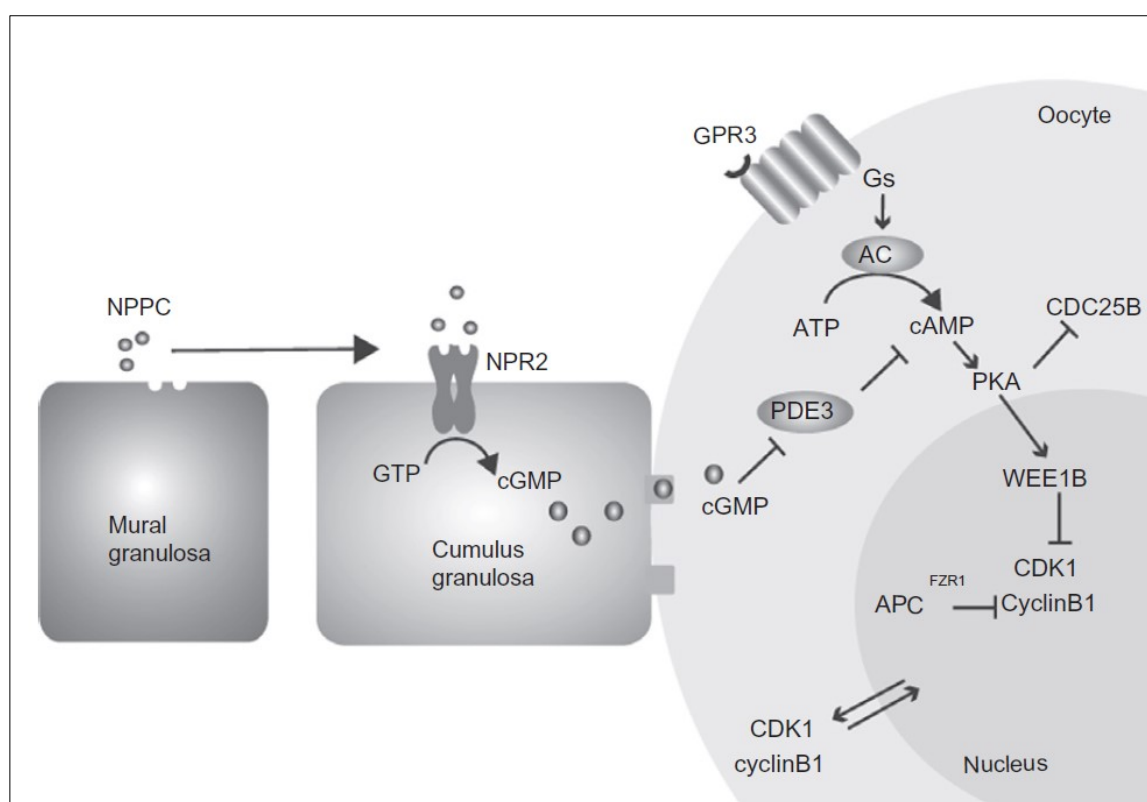
3.1.5 Regulace meiotického zrání

Řízení zrání oocyty zahrnuje komplexní souhru mezi oocytem a extracelulárním prostředím. Jedinečnou vlastností oocytů je zastavení meiotického dělení v profázi I fetálního vývoje do pohlavní dospělosti. Plně dorostlý oocyt je v meiotickém bloku v profázi I držen díky signálním faktorům, které jsou produkovány oocytem a somatickými buňkami ve folikulu. Buňky exprimující signální faktory jsou spíše murální buňky než kumulární, jež přímo obklopují oocyt. Z toho důvodu dochází k spontánnímu obnovení meiózy po vyjmutí COCs z folikulu. Na rozdíl od kumulárních buněk se na povrchu murálních buněk nacházejí receptory pro LH, který představuje fyziologický stimul pro obnovení meiózy *in vivo* (Richards et al., 2002).

3.1.5.1 Cyklické nukleotidy

Udržení meiotického bloku vyžaduje zvýšenou hladinu cyklického adenosin monofosfátu (cAMP), který je vytvářen jak granulózními buňkami a do oocyty se dostává přes gap junctions, tak oocytem samotným. Oocyt vytváří cAMP přes konstitutivně aktivní receptory GPR3 (G-protein coupled receptor 3) nebo GPR12 (G-protein coupled receptor 12), které stimulují adenylát cyklázu (Mehlmann et al., 2004; Norris et al., 2007). Adenylát cykláza vytváří cAMP z ATP jeho cyklizací. Vyjmutím oocytů z antrálních folikulů hladina cAMP poklesne a samovolně se obnoví meióza. Spontánnímu zrání může být zabráněno přidáním analogů cAMP jako je např. dibutyryl-cAMP (dbcAMP), či inhibicí cAMP fosfodiesterázy. Kumulární buňky obsahují guanylát cyklázu tzv. receptor natriuretického peptid prekurzoru-C (NRP2) produkující cyklický guanosin monofosfát (cGMP) (Norris et al., 2009). Rolí cGMP je nepřímo udržovat vyšší hladiny cAMP v oocyty, a to inhibicí fosfodiesterázy 3A (PDE3A), která primárně hydrolyzuje cAMP (Masciarelli et al., 2004). Exprese NRP2 je udržována estradiolem (E2) a jeho aktivita je iniciována vazbou natriuretického peptidu typu C (NPPC) tvořeného murálními buňkami (Obr.2) (Zhang et al., 2011). Odpovědí na LH vlnu je snížení exprese NPPC, což má za následek utlumení aktivity guanylát cyklázy NRP2 a pokles koncentrace cGMP v oocyty (Norris et al., 2009; Robinson et al., 2012). Následně dochází k aktivaci fosfodiesteráz a snížení hladiny cAMP, to iniciuje další signální kaskády kulminující obnovením meiózy a GVBD.

Jednou z cílových molekul cAMP je proteinkináza A (PKA) podílející se na udržení meiotického bloku. Před GVBD dochází k poklesu koncentrace cAMP, což má za následek pokles aktivity PKA (Lazar et al., 2002). Hlavními substráty PKA jsou Wee 1 (Wee1-like protein kinase)/MYT 1 kinázy (membrane-associated tyrosine- and threonine-specific cdc2-inhibitory kinase) a CDC25 fosfatázy (cell division cycle 25 phosphatases), které přímo regulují aktivitu cyklin dependentní kinázy 1 (CDK1) (Oh et al., 2010). Ve studii Lincoln et al. (2002) prokázali neschopnost oocyty s knockoutovanou CDC25B fosfatázou obnovit meiózu i přes aktivní CDC25A a CDC25C fosfatázy, což prokazuje její esenciální roli v aktivaci CDK1 na rozdíl od ostatních fosfatáz z rodiny CDC25.



Obrázek. 2: Signalizační kaskády udržující plně dorostlý savčí oocyt v Profázi I. G-protein propojený s GPR membránovým receptorem stimuluje funkci adenylát cyklázy (AC). Vzniká cAMP stimulující funkci PAK. Hydrolýze cAMP enzymem PDE3A je zabráněno produkcí cGMP guanylát cyklázou NPR2 v kumulárních buňkách za stimulace ligandem NPPC. Převzato z Holt et al. (2013).

3.1.5.2 MPF (metaphase promoting factor)

Zásadní roli v iniciaci meiózy a GVBD má faktor MPF. Jedná se heterodimerní proteinový komplex složený z cyklin dependentní kinazy 1 (CDK1, známé také jako $p34^{cdc2}$) a regulační podjednotky cyklinu B (Sorensen et al., 1985; Maller et al., 1989). Funkcí MPF je především navození GVBD fosforylací laminů jaderné membrány, účast na kondenzaci chromozomů, vytvoření dělicího vřeténka a iniciace segregace chromozomů.

Během meiotického bloku je aktivita CDK1 inhibována fosforylací na threoninu14 (T14) a tyrosinu15 (Y15) kinázami Wee/MYT 1. Naopak iniciaci aktivity MPF zahajuje defosforylace CDC25B fosfatázou na stejném místě. Obecně jsou T14 a Y15 fosforylovány po asociaci CDK1 s cyklinem B během fáze růstu oocyty (Kikuchi et al., 2000). V této neaktivní formě je komplex označován jako pre-MPF a nachází se v oocytech s ukončeným růstem (Murray and Kirschner 1989). Pro aktivaci komplexu je nutná fosfatáza CDC25B, která je regulována činností PKA (viz výše) a polo-like kinázou 1 (Plk1). Plk1 podněcuje přesun cyklinu B z cytoplasmy do jádra a podílí se tak na aktivaci MPF (Anger et al., 2003). Plk1 se mimo jiné účastní na organizaci dělicího vřeténka. Ve studii na myších oocytech byla zaznamenána lokalizace Plk1 na pólech dělicího vřeténka. S postupem meiózy z anafáze I do telofáze I došlo k přesunu Plk1 do středové oblasti dělicího vřeténka (Wianny et al., 1998; Solc et al., 2015).

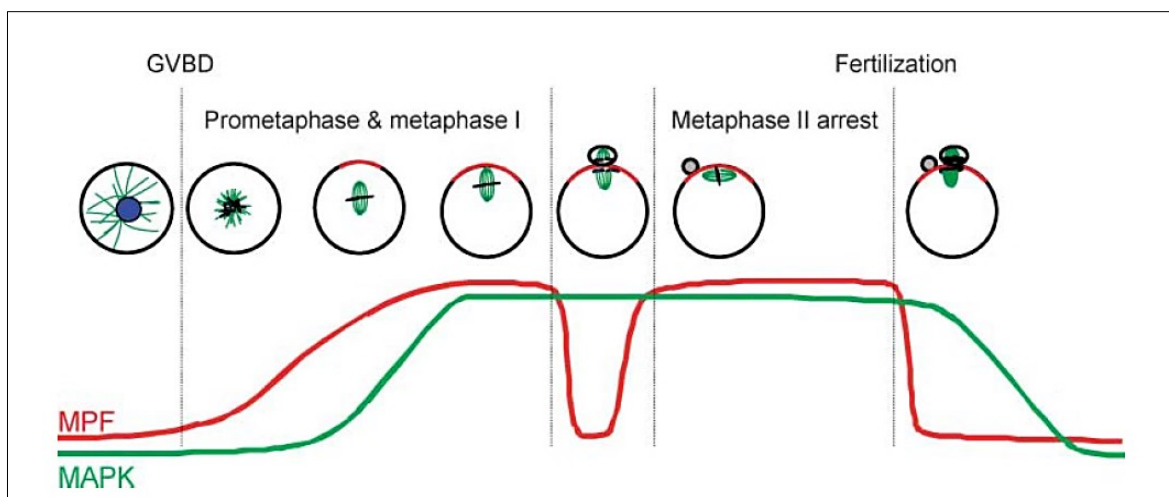
Průběh meiózy je řízen rovnováhou mezi degradací a syntézou cyklinu B podobně jako u mitotického dělení. Degradace cyklinu B při přechodu z metafáze do anafáze je způsobena komplexem podporujícím anafázi (APC). APC je ubikvitin-ligáza označující cyklin B pro degradaci v proteazomu. APC vyžaduje vazbu koaktivačních proteinů CDC20 (cell-division cycle protein 20) nebo FZR1 (fizzy-related protein homolog), které udělují specifitu vazby enzymu k substrátu (Peters 2006; Jones 2011). Bylo zjištěno, že v oocytech s inhibovanou expresí FZR1 dochází k akumulaci cyklinu B a předčasnému GVBD (Yamamuro et al., 2008; Holt et al., 2011).

3.1.5.3 MAP kináza (mitogen-activated protein kinase)

Dalším regulačním systémem fungujícím paralelně s MPF a řídícím meiotický cyklus je MAP kinázová kaskáda. MAPK jsou označovány také jako extracelulárně regulované

kinázy (ERK) a řadí se do rodiny serin/threonin proteinových kináz. Savčí oocyty exprimují dvě izoformy MAPK: ERK1 a ERK2. Obě hrají důležitou roli při regulaci v meióze (Sun et al., 1999). K jejich plné aktivaci dochází po fosforylaci kinázami Mos (Proto-oncogene, serine/threonine kinase) a MEK (Mitogen-activated protein kinase kinase) na aminokyselinových zbytcích tyrosinu a threoninu. MEK je přímo aktivována Mos kinázou, která je produktem onkogenu *c-mos* (Crews a Erikson 1992). Inhibice *c-mos* genu v myších oocytech měla za následek narušení prvního meiotického dělení a vydělení prvního pólového tělíska (Paules et al., 1989). Nejznámějším substrátem MAPK, který pravděpodobně zprostředkovává většinu regulací v průběhu buněčného cyklu, je kináza p90rsk (90 kDa ribosomal s6 kinases). Jednou z funkcí p90rsk je inaktivace MYT 1, která inhibuje MPF (Palmer et al., 1998).

MAPK fosforyluje v některých případech stejné substráty jako MPF a z toho důvodu se jejich regulační dráhy překrývají. Nicméně aktivita MAPK není snížena při přechodu mezi metafází I a II na rozdíl od MPF (Obr. 3). MAPK udržuje chromozomy v kondenzovaném stavu fosforylací jejich histonů a tím předchází vstupu oocyty do interfáze. Podílí se také na fosforylaci laminů jaderné membrány, čímž zabraňuje jejímu vytvoření. Načasování aktivace MAPK se mezi modelovými organizmy savců liší. U myších oocytů dochází k aktivaci MAPK po dvou hodinách od GVBD. Z toho důvodu není MAPK vyžadována při iniciaci meiózy u myší (Verlhac et al., 1993). Na druhou stranu u bovinních oocytů došlo k simultánní aktivaci MPF a MAPK před GVBD (Fissore et al., 1996). Názory na dobu aktivace obou kináz MPF a MAPK u prasečích oocytů jsou různé. Ve studii Inoue et al. (1995) zaznamenali první iniciaci funkce MAPK u malého počtu oocytů po 18 hodinách kultivace, která odpovídá GVBD. Náhlé zvýšení aktivity MAPK bylo pozorováno v MI fázi po 30 hodinách a svého vrcholu dosahovala v bloku v MII fázi. Výsledky studie prokazují počáteční aktivaci MPF předcházející iniciaci MAPK. Stejný jev byl pozorován u lidských oocytů (Sun et al., 1999a). Naopak několik studií prokázalo, že iniciace MAPK probíhá před GVBD a dříve než aktivace MPF (Wehrend a Meinecke 2001a; Villa-Diaz a Miyano 2004). Rozdílné výsledky mohou být způsobeny rozdílným způsobem a dobou kultivace.



Obrázek.3: Schéma aktivity regulačních faktorů MPF a MAPK v průběhu meiotické zrání savčích oocytů. Červená čára zobrazuje aktivitu MPF, která klesá v průběhu vydělení polárního tělíska. Zelená čára zobrazuje působení MAPK, které je mezi přechodem z metafáze I do metafáze II konstantní. Upraveno dle Brunet a Maro, (2005)

3.1.5.4 CSF (cytostatic factor)

Funkce CSF v regulaci meiotického zrání spočívá v zastavení oocyty v metafázi II tzv. CSF blok neboli II. meiotický blok. CSF udržuje vysoké hladiny MPF a zabraňuje tak přechodu do anafáze II. CSF není charakterizován jednou molekulou nebo proteinem, ale spíš jako soubor faktorů schopných inhibovat buněčné dělení. Následně po oplození nebo partenogenetické aktivaci je CSF blok odstraněn. CSF byl poprvé objeven v oocytech obojživelníků. Masui, (1991) mikroinjikoval cytoplasmu zralého oocyty do blastomery embrya a zjistil, že u blastomer došlo k zastavení buněčného cyklu před další mitózou neboli dalším dělením. Ve studii Sagata et al. (1989) našli protein Mos potřebný pro zajištění správné funkce CSF. Další studie identifikovaly komponenty signální kaskády iniciované Mos vedoucí k aktivaci CSF bloku, a to včetně MEK1, MAPK, p90rsk (Gross et al., 1999) a proteinů Bub1 (mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase Bub1), Mad1 a Mad2 (mitotic spindle assembly checkpoint protein Mad), nacházejících se na kinetochorech chromozomů (Tunquist et al., 2003). Předpokládá se, že všechny CSF dráhy vedou k inhibici APC a zabraňují tak degradaci cyklinu B a poklesu koncentrace MPF (Tunquist a Maller, 2003). Další výzkum v této oblasti objevil inhibitory APC z rodiny Emi (early mitotic inhibitor) /Erp (emi-related protein) proteinů. Do této rodiny patří

proteiny Emi1 a Erp1/Emi2, které oba přímo inhibují APC (Reimann a Jackson, 2002). Emi1 je syntetizován během S fáze a jeho vazba na aktivátor APC vede k inhibici funkce komplexu pomocí cdc20 (Reimann et al., 2001). Regulovaná destrukce Emi1 a Erp1/Emi2 po oplození spouští uvolnění z CSF bloku a dokončení druhého meiotického dělení (Tung et al., 2005).

3.1.5.5 Vápník

Vápník se podílí na signalizacích v oocyty od začátku oogeneze až po fertilizaci. Zvláště pak při přechodu mezi meiotickými děleními, které jsou regulovány náhlými nárůsty intracelulárního vápníku (Pozzan et al., 1994). Dvěma druhy specializovaných kanálů umožňující průchod Ca^{+2} z buněčných kompartmentů do cytosolu jsou ryanodinové receptory (Ryr) a inositol 1,4,5- trifosfátové receptory (IP_3r) (Petr et al., 2002). Inositolfosfolipidová signalizace začíná aktivací fosfolipázy C (PLC) například LH vlnou. Membránový fosfatidylinositol-4,5bisfosfát (PIP_2) je hydrolyzován pomocí PLC na inositol-1,4,5-trifosfát (IP_3) a 1,2-diacylglycerol (DAG). IP_3 poté difunduje cytosolem a váže se na IP_3r umístěné v membráně endoplasmatického retikula, následně dochází k uvolnění velkého množství Ca^{+2} do cytoplasmy (El-Jouni et al., 2005). Ryr nacházející se na membráně endoplasmatického retikula nebo sarkoplasmatického retikula jsou aktivovány vazbou ryanodinu, cADPR (cyclic APD-ribose) a kofeinem (Petr et al., 2002). Dle Tesařík a Sousa (1996) Ca^{+2} uvolněný z kompartmentů s IP_3r nacházejících se u kortexu buňky spouští uvolnění Ca^{+2} z Ryr kompartmentů ve středu buňky tzv. dvoustupňový model uvolnění vápníků. Nezastupitelná role oscilace Ca^{+2} je nezbytná především v aktivaci oocyty po oplození (Tesarik a Sousa, 1996).

Důležitost intracelulární oscilace Ca^{+2} pro znovuzahájení meiózy byla prokázána také u oocytů myši (De Felici et al., 1991) a prasat (Kaufman a Homa, 1993). U prasat zvýšení vápníku v cytoplasmě předchází o dvě hodiny GVBD (Kaufman a Homa, 1993). Akumulace cAMP byla naměřena v myších oocytech po inkubaci s forskolinem. Pokles hladiny cAMP byl následně zaznamenán po navýšení intracelulární koncentrace Ca^{+2} . Tyto výsledky poukazují na funkci Ca^{+2} v inhibici AC a spolu s PDE3A se tak podílí na snížení cAMP v oocyty před vystoupením z meiotického bloku (Horner et al., 2003).

3.1.5.6 Steroidní hormony

Obecný mechanismus genomického působení steroidů spočívá v regulaci genové transkripce. Volné steroidy vstupují do buňky pasivní difuzí nebo pomocí transportéru a afinitně se váží na specifické cytoplasmatické nebo jaderné receptory. Aktivovaný komplex receptoru a hormonu interaguje se specifickými sekvencemi DNA označovanými jako elementy odpovědi na steroidy a spouští transkripci (Nawaz et al., 1992). Negenomické účinky steroidu jsou iniciovány vazbou na specifické membránové receptory a následným spuštěním konkrétní signální kaskády prostřednictvím sekundárních posílů (Morley et al., 1992). Rychlost odpovědi na genomické dráhy trvá rámcově několik hodin na rozdíl od membránových receptorů, které aktivují negenomickou signalizaci během několika minut po navázání ligandu.

Estradiol (E2) je primárně produkován granulózními buňkami ve folikulu pod vlivem FSH. Lokální účinky E2 v ovariích zahrnují: stimulaci folikulogeneze, zvýšení exprese receptorů pro gonadotropiny v granulózních buňkách, regulaci tvorby gap junctions mezi kumulárními buňkami a oocytem, inhibici apoptózy granulózních buněk a formaci žlutého tělíska (Rosenfeld et al., 2001). E2 je také spolu s dalšími faktory, jako je inhibin, růstový faktor podobný insulinu (IGF-I) a jeho vazebné proteiny (IGFBPs), zapojený do výběru dominantního folikulu pro ovulaci (Ginther et al., 2003). Ve folikulární tekutině dominantního folikulu bylo naměřeno signifikantně více E2 než u jiných folikulů (Bodensteiner et al., 1996). Princip působení E2 je založen na vazbě na estrogenní receptory (ERs). ER α a ER β jsou členy superrodiny steroidních receptorů, které disponují DNA vazebnou doménou složenou ze dvou zinkových prstů a C koncovou doménou vázající ligand. Sekvenční rozdíl mezi receptory je především v N- a C- koncových oblastech (Mosselman et al., 1996).

Úloha E2 během maturace oocyty je méně známá. Nicméně studie Liu et al. (2017) prokázala významný vliv E2 v udržování meiotického bloku. E2-ERs signalizační dráha reguluje expresi NPPC a NRP2 přímou vazbou na jejich promotory. Zvýšená hladina NPPC a NRP2 udržuje oocyt v meiotickém bloku stimulací produkce cGMP (Vaccari et al., 2009). Po LH vlně se hladiny E2 snižují. Dochází k redukci NPPC a NRP2 a obnovení meiózy. U myší s knock-outovanými geny pro ERs nebyl meiotický blok udržován u většiny oocytů a docházelo k předčasnému obnovení meiózy v předovulačních

folikulech. Mimoto byla zaznamenána redukce počtu NPPC/NRP2 mRNA (Liu et al., 2017). Přidáním E2 do kultivačního media došlo k inhibici GVBD u většiny prasečích oocytů (Richter a McGaughey, 1979; Bing, 2001). Inhibiční efekt po kultivaci s E2 byl zaznamenán také u bovinních oocytů, kde se projevil poklesem podílu oocytů dosahujících MII fáze. Po přidání FSH do kultivačního media došlo k procentuálnímu navýšení zralých oocytů. FSH pravděpodobně potlačuje inhibici jaderné maturace E2 (Beker et al., 2002)

Progesteron je produkován kumulárními buňkami v průběhu meiotického zrání COCs. Hladiny progesteronu jsou navyšovány činností LH a FSH u lidských a prasečích COCs (Racowsky, 1985; Chian et al., 1999). K prudkému nárůstu koncentrace progesteronu ve folikulární tekutině dochází po 20 hodinách od LH vlny, což koreluje s vystoupením oocytu z meiotického bloku (Coskun et al., 1995; Chian et al., 1999). Aminoglutethimid inhibující biosyntézu progesteronu významně snížil jeho hladiny a potlačil tak zrání prasečích oocytů. Výsledky této studie naznačují potenciální roli progesteronu v znovuzahájení meiotického dělení. Možný mechanismus účinku progesteronu při GVBD je snížení exprese conexinu 43 účastnícího se na tvorbě gap junctions mezi kumulárními buňkami a oocytem. Nedostatek mezibuněčných spojů vede ke snížení hladiny cAMP v oocytech a obnovení meiózy (Shimada, 2002). Regulace exprese conexinu 43 progesteronem byla prokázána i v lidských svalových buňkách močového měchýře (Zhao et al., 1996).

Výsledky studií vlivu testosteronu na meiotické zrání savčích oocytů se mezi sebou liší. Ovšem u obojživelníků druhu drápatky vodní (*Xenopus laevis*) je testosteron znám jako účinný aktivátor meiotického zrání (Goascogne et al., 1985; Lutz et al., 2001). Aktivace MAPK testosteronem byla popsána nejen u drápatek, ale i u myší (Gill et al., 2004) a prasat (Li et al., 2008). Kontrastní výsledek byl popsán ve studii na myších oocytech, kde testosteron v kombinaci s dbcAMP vykazoval supresivní efekt na zahájení meiózy (Ecay a Powers, 1990). Inhibice androgenních receptorů nebo jejich knock-out v myších oocytech významně narušil meiotické zrání, což naznačuje možnou roli androgenů ve zrání oocytu a vývoji folikulů (Yeh et al., 2002; Sen a Hammes, 2010).

3.2 Endokrinní disruptory

Podle americké Agentury pro ochranu životního prostředí (U.S. Environmental Protection Agency, EPA) jsou endokrinní disruptory (EDs) definovány jako „exogenní látky narušující syntézu, sekreci, metabolismus, sílu vazby a eliminaci endogenních hormonů přítomných v těle, jejichž funkcí je udržovat homeostázu, řídit reprodukci a vývoj organismu“ (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). Skupina molekul identifikovaných jako EDs je vysoce heterogenní. Patří mezi ně pesticidy (dichlorodiphenyltrichloroethane, DDT), změkčovače plastů (di-ethylhexylftalát, DEHP), léčiva (diethylstilbestrol, DES) a monomery plastů (bisfenoly), přírodní látky fytoestrogeny (genistein) a mnohé další. Vlastností EDs je narušení rovnováhy hormonů. Celkový vliv závisí na mnoha faktorech: koncentraci EDs a přirozených hormonů v krvi, jejich vzájemných interakcích a zejména na období expozice organismu. Expozice EDs během citlivého období vývoje organismu může vést ke změnám v diferenciaci tkání a organogenezi (Saal et al., 1997). Účinky pozorované na zvířecích modelech po vystavení EDs korelují se změnami v ženské nebo mužské reprodukci, neuroendokrinologii, dále korelují s rozvojem metabolických poruch (Trasande et al., 2012) a častějším výskytem rakoviny prsu (Brama et al., 2007) a prostaty (Ho et al., 2006).

S imitací funkce endogenních hormonů souvisí i vlastnost EDs působit při velmi nízkých dávkách, tzv. efekt nízké dávky. EDs působí zcela specifickým způsobem a vymykají se tak klasickému toxikologickému dogma, kdy se zvyšující se koncentrací látky se zvedá i její toxický efekt (Melnick et al., 2002). Odpověď organismu na EDs je často nelineární. Nejvyššího účinku lze např. dosáhnout u nejnižších a nejvyšších koncentrací, zatímco minimálního účinku při střední koncentraci (tzv. křivka U). Naopak může dojít k největší odezvě organismu při středních dávkách (tzv. křivka invertovaného U). V některých případech může být křivka odezvy podstatně komplikovanější a tvořit různé kombinace křivky U a invertovaného U. Popsaný jev se nazývá nemonotónní odpověď. Mechanismy vytvářející nemonotónní odpovědi jsou např. cytotoxicita, tkáňově specifické receptory a kofaktory, desenzibilace a endokrinní zpětnovazebné regulace (Vandenberg et al., 2012). Většina EDs má tendenci vázat se primárně na receptory steroidních hormonů včetně estrogenních receptorů (ERs), androgenních receptorů (ARs), progesteronových

receptorů (PRs) a thyroideálních receptorů (TRs). Na základě známých mechanismů v signálních drahách ERs můžeme popsat způsob působení endokrinních disruptorů imitujících estrogeny, např. BPA. BPA je schopen interagovat s jadernými ER α a ER β nebo s membránovými ERs spřaženými s G proteinem (GPR30) (Thomas a Dong, 2006), čímž narušuje genomické a nengenomické signální dráhy aktivované estrogeny. Kromě imitace hormonů se některé EDs chovají jako antagonisté. Váží se na specifický receptor a inhibují tak typickou odpověď a vazbu příslušného hormonu. EDs mohou také spouštět signalizaci, která není typickou odpovědí na endogenní hormon (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

3.2.1 Bisfenol A

BPA (4,4'- (propane-2,2-diyl) diphenol) je v poslední době hojně studovaným EDs. BPA byl poprvé nasyntetizován v roce 1891 a již v roce 1936 byla prokázána jeho schopnost napodobovat hormon E2. Schug et al. (2011) řadí BPA mezi nejvíce užívané průmyslové chemikálie pro výrobu plastových polymerů. V roce 2015 dosáhla celosvětová roční produkce BPA 5 milionů tun (Yamazaki et al., 2015). BPA je přítomen zejména v polykarbonátových plastech, epoxidových pryskyřicích a v některých papírových produktech. Potencionálními zdroji BPA monomeru je řada konzumního zboží (dětské láhve, stomatologické materiály, obaly potravin atd.). Monomer BPA se z polymeru uvolňuje po vystavení vysokým teplotám, UV radiaci, alkalickému ošetření a intenzivnímu mytí (Mileva et al., 2014). V USA byla naměřená průměrná koncentrace BPA v podzemní vodě mezi 0.0041 a 1.9 mg/m³. Přítomnost BPA byla detekována skoro ve všech tělních tekutinách, tj. krevním séru (Cobellis et al., 2009), moči (Casas et al., 2013), plodové vodě, folikulární tekutině, amniové tekutině (Ikezuki et al., 2002), mateřském mléce (Mendonca et al., 2014) a v seminální plazmě (Vitku et al., 2015). Díky lipofilní povaze BPA dochází k jeho ukládání do tukové tkáně. Následkem je bazální uvolňování BPA do krevního oběhu z tukové tkáně (Berni et al., 2019).

Regulace reprodukční soustavy je složitý proces, ve kterém interagují hormony na úrovni hypotalamo – hypofyzárně – gonadální osy s pohlavními orgány. Z tohoto důvodu má BPA široké spektrum negativních účinků zejména v oblasti reprodukce. Vliv BPA na

syntézu hormonů štítné žlázy byl prokázán díky inhibici thyroideální peroxidázy po expozici BPA *in vitro* (Schmutzler et al., 2004). Ve studii Ben Maamar et al. (2015) pozorovali působení BPA na vývoj varlat potkana a lidí. V obou případech se potvrdil anti-androgenní efekt BPA závislý na koncentraci.

Vaječníky mají klíčovou reprodukční a endokrinní funkci v organismu ženy. BPA je proto často označován jako ovariální toxikant. BPA ovlivňuje nejen celkovou morfologii vaječníků, ale také snižuje kvalitu oocytů jak u lidí (Ehrlich et al., 2012; Machtinger et al., 2013), tak u zvířat (Trapphoff et al., 2013). Zvýšená sekrece E2 v preovulační fázi cyklu reguluje proliferaci a diferenciaci buněk děložního epitelu. Z toho důvodu působí hladiny E2 na úspěšnou implantaci blastocyst. Lineární korelace mezi četností selhání implantace blastocyst a koncentrací BPA v moči byla naměřena u 137 pacientek IVF centra (Ehrlich et al., 2012a). Estrogenní vlastnosti BPA pravděpodobně ovlivňují implantaci blastocyst dvěma způsoby. Akcelerací vývoje blastocysty vedoucí k neshodě načasování implantace do děložní sliznice (Takai et al., 2001), nebo přímým snížením receptivity dělohy (Berger et al., 2010). Ve studii Mok-Lin et al. (2010) zjistili spojitost mezi vyššími hladinami BPA v moči, snížením maximální sérové koncentrace E2 a menším počtem získaných oocytů u žen podstupujících IVF léčbu. Několik studií poukazuje na spojitost mezi BPA a narušením procesů souvisejících s epigenetickými modifikacemi. Expozice březích myší fyziologickým hodnotám BPA měla za následek změny v genomickém imprintingu a vedla ke zhoršenému vývoji placenty a zárodků (Susiarjo et al., 2013). Snížená hladina metylace lyzinu K4 na histonu H3 (H3K4me2) byla naměřena v oocytech vystavených koncentracím BPA *in vitro*. Úroveň exprese mRNA pro DNA methyl transferázu *Dnmt3b* byla v pokusných oocytech podstatně redukována oproti kontrole (Wang et al., 2016). *In vitro* kultivace myších folikulů ve 3 nM koncentraci BPA měla za následek jak změny v DNA methylaci, tak v posttranslační úpravě histonů (Trapphoff et al., 2013b).

Následkem mnoha studií prokazujících negativní účinky BPA na endokrinní systém došlo k regulaci či zákazu užívání BPA pro výrobu spotřebního zboží. V roce 2015 EFSA (European Food and Safety Authority) prohlásila za tolerovaný denní příjem BPA 4 µg/kg tělesné hmotnosti/den (EFSA, 2015). Evropská Unie zakázala výrobu kojeneckých

lahví obsahujících BPA v roce 2011. Zvýšené celosvětové regulace vyústily ve využívání dalších druhů bisfenolů jako alternativních náhrad za BPA.

3.2.2 Bisfenol S

BPS (4,4'-sulfonyldiphenol) je označován za bezpečnější náhradu díky lepší stabilitě při vysokých teplotách a při vystavení slunečnímu záření. BPS není uvolňován do prostředí v takovém množství jako BPA, na druhou stranu se díky své stabilitě hůře metabolizuje a může zůstat v organismu delší dobu (Héliès-Toussaint et al., 2014). Strukturní podobnost BPS s endogenními estrogeny a BPA vzbuzuje obavy ohledně jeho bezpečnosti a potenciálních endokrinně disruptivních vlastností. Nedávné studie testující mechanismy působení BPS potvrdily jeho schopnost imitovat estrogení odpověď (Campen et al., 2018).

Produkce BPS neustále stoupá, přičemž v Evropské unii se vyprodukuje až 10 000 tun ročně (Ivry Del Moral et al., 2016). Výzkumná skupina Danzl et al. (2009) porovnávali schopnost biodegradace BPA, BPS a BPF ve slané vodě. BPS vykazoval ze všech tří bisfenolů nejhorší rozložitelnost, což vede k akumulaci v prostředí a ekologické zátěži. BPS vstupuje do lidského těla nejen dermální penetrací, ale také konzumací kontaminovaných potravin či pitné vody a inhalací kontaminovaného prachu. V povrchové vodě (Jin a Zhu, 2016) a bytovém prachu (Liao et al., 2012b) byla již přítomnost BPS také prokázána.

S ohledem na nižší počet studií zaměřených na BPS byl jeho výskyt ověřen prozatím jen v některých lidských tělních tekutinách. Koncentrace BPS v moči se pohybuje mezi 0.02 ng/ml a 21 ng/ml (Liao et al., 2012), v krevním séru čínského obyvatelstva byl BPS detekován v průměru 0.65 ng/ml (Wan et al., 2018), dále v seminální plazmě 0.12 až 0.17 ng/ml (Smarr et al., 2018) a v mateřském mléce 0.68 ng/ml (Niu et al., 2017).

Většina studií poukazuje na slabší estrogení aktivitu BPS než má BPA a E2 (Chen et al., 2002). Na druhou stranu výsledky studie Viñas a Watson (2013a, 2013b) prokázaly srovnatelnou estrogení aktivitu BPS s fyziologickým E2. Ve femtomolární a pikomolární koncentraci se BPS vázal na membránové estrogení receptory mER α a mER β a stimuloval negenomické dráhy regulované E2. Membránově zprostředkované

signalizace vedly k aktivaci kaspázy 8, buněčné proliferaci a spuštění MAPK signalizační dráhy. Obecně má BPS vliv na apoptickou a proliferační signalizaci důležitou pro optimální funkci buňky. Výzkumná skupina Yamasaki et al. (2004) popsala přímou vazbu BPS na jaderné ER α a ER β spouštějící genomickou signalizaci. Distribuce BPS po celém těle je umožněna vazbou na sérové albuminy podobně jako je tomu u BPA (Mathew et al., 2014). Studie zkoumající analogy BPA prokázala schopnost BPS významně zvyšovat hladiny progesteronu na rozdíl od BPA, kde nebyly zaznamenány žádné změny (Rosenmai et al., 2014). Prozatím je dostupný velice omezený počet studií zkoumajících účinky BPS na lidské zdraví a reprodukci v porovnání s počtem studií o BPA. Nicméně několik nedávných studií se již zabývalo testováním vlivu BPS v organismu ryb a savců.

Hladina steroidních hormonů přímo ovlivňuje sexuální diferenciaci ryb. V experimentu se zebřičkami (*Danio rerio*) byla naměřena vyšší hladina estrogenu u samic i samečků a nižší hladina testosteronu u samečků po kultivaci embryí ošetřených BPS. Odlišné hormonální hladiny vedly ke změně v poměru zastoupení pohlaví ve prospěch samic. Ve stejné studii bylo naměřeno signifikantní snížení hladiny thyroxinu a trijodthyroninu v plazmě po vystavení dávkám BPS (Naderi et al., 2014). Negativní efekt BPS byl zaznamenán i na množství vajíček a spermií a na zvýšeném počtu malformací embryí zebřiček (Ji et al., 2013).

Perinatální expozice BPS vyvolala u myši změny ve složení metabolitů spojených s metabolismem glukózy a tuků, čímž se zvýšilo riziko rozvoje obezity (Meng et al., 2018). Stejný vliv BPS na obezitu byl prokázán u samců myši v navazující studii stejného výzkumného týmu. Kromě změn v metabolismu glukózy a tuků byl zaznamenán také nárůst hmotnosti jater a tvorby bílé tukové tkáně. Významně vyšší exprese genů zapojených do zánětlivých drah byla naměřena v jaterní tkáni (Meng et al., 2019).

Myším samicám byly v *in vivo* studii podávány nízké koncentrace BPS simulující reálný výskyt v životním prostředí. U skupiny myši přidaným BPS ve vodě došlo k redukci hmotnosti ovarií a počtu primárních a preantrálních folikulů. Dále byl zaznamenán zvýšený objem antrálních folikulů, což může být vysvětleno jako kompenzační reakce k redukci počtu folikulů. Ve stejné studii analyzovali změny v metylaci DNA, přesněji 5meC a dimethylaci lysinu K27 na histonu H3 (H3K27me2). Měřením intenzity fluorescenčního signálu byly zaznamenány změny v metylaci H3K27me2 u oocytů

vystavených různým koncentracím BPS. Toto zjištění demonstruje obdobnou epigenetickou aktivitu, která byla zaznamenána u BPA (Nevoral et al., 2018).

BPS vyvolal u myší změnu v expresi genů regulovaných estradiolem IGF-1 a EGF-R v děloze a ve vaječnících. Exprese těchto genů je iniciována v pozdních fázích folikulogeneze. BPS imitoval funkci E2 a stimuloval expresi výše zmíněných genů, v souladu s tím byl pozorován zvýšený počet zralých folikulů po expozici BPS (Hill et al., 2017). Nourian et al. (2017) zkoumali efekt BPS na plodnost myších samic a míru oxidativního stresu v ovariální tkáni. U myší vystavených vyšším koncentracím BPS (tj. 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a více) došlo k významnému snížení úspěšnosti oplození a počtu zygot nebo blastocyst na rozdíl od myší vystavených nízkým koncentracím BPS. Nicméně, měřením peroxidace lipidů ve vaječnících se prokázalo, že všechny koncentrace BPS způsobují u samic myší oxidační stres. Co se týče spermatu myší, bylo pozorováno snížené množství a horší pohyblivost spermií u samečků v BPS pokusných skupinách (Shi et al., 2017).

Negativní efekt BPS na *in vitro* zrání prasečích oocytů byl prokázán také ve studii našeho týmu, na kterou navazují výsledky předložené práce (Žalmanová et al., 2017). Oocyty kultivované ve třech skupinách dle koncentrace BPS (3 nM, 300 nM or 30 μM) vykazovaly pokles počtu oocytů ve fázi MI po 24 h a MII po 48 h. Po kultivaci oocytů v 300 nM koncentraci byla významně zvýšená produkce kyseliny hyaluronové kumulárními buňkami. Tato koncentrace zřejmě imituje hormonální stimulaci podněcující expanzi kumulárních buněk v průběhu meiotického zrání. Dále byl prokázán vliv BPS na mRNA transkripty ER α , ER β a aromatázy v oocyty a kumulárních buňkách. Množství transkriptů ER α bylo významně sníženo po kultivaci v BPS při všech koncentracích. Stejný jev byl pozorován u transkriptů aromatázy po kultivaci při koncentracích 3nM a 300nM BPS (Žalmanová et al., 2017). Vliv BPS na fyziologii organismů v souvislosti s jeho nárůstem v životním prostředí je předmětem současného zkoumání.

4 Hypotéza a cíle práce

Na základě prostudování dostupné odborné literatury byla stanovena hypotéza, podle které bisfenol S negativně ovlivňuje meiotické zrání prasečích oocytů *in vitro*.

Pro ověření hypotézy byly stanoveny následující cíle:

1. Prokázat vliv BPS na celkový průběh meiotického zrání
2. Prokázat vliv BPS na utváření dělicího vřeténka sledováním α -tubulinu během meiotického zrání
3. Prokázat vliv BPS na integritu mitochondrií během fáze zrání
4. Prokázat vliv BPS na integritu chromatinu během fáze zrání

5 Materiály a metodika

5.1.1 Chemikálie

Médium 199 (Gibco, UK)

Bovinní fetální sérum (GincoBRL, Life Technologies, Germany)

Gentamicin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Hydrogen uhličitán sodný (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Laktát vápenatý (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Lidský choriový gonadotropin (PG 600, Intervet Boxmeer, Holand)

Koňský choriový gonadotropin (PG 600, Intervet Boxmeer, Holand)

PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

NaN₃ (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

NGS (Abcam, Cambridge, UK)

Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Triton X-100 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)

DMSO (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)

MitoTracker red (Thermo Fisher Scientific, USA)

Anti- α tubulin (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)

Anti-MFN1 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)

DAPI (Thermo Fisher Scientific, USA)

FITC konjugovaná Kozí Anti-Myší IgG sekundární protilátka (Abcam, Cambridge, UK)

Kultivační medium: M199 obohacené o HEPES (1.5 mg/ml), laktát vápenatý (0,6 mg/ml), hydrogen uhličitán sodný (0,039 ml 7% roztoku na 1 ml média), gentamicin (0,0025 mg/ml), 5% bovinní fetální sérum

5.1.2 Izolace a získávání oocytů

Pro experimenty byly použity vaječníky jatečně poražených prepubertálních prasnic. Vaječníky byly do laboratoře převezeny v termoláhvi a byly udržovány při stálé teplotě 38 °C.

COCs byly z vaječníků získávány metodou aspirace. Folikulární tekutina s COCs byla nasávána 10 ml injekční stříkačkou (s jehlou 10G) z folikulů o velikosti 2-5 mm v průměru. Pod stereomikroskopem byly pomocí kapiláry vybrány COCs s ukončeným růstem. Pro COCs s ukončeným růstem je charakteristická homogenní cytoplasma, kompaktní obal čítající nejméně dvě vrstvy kumulárních buněk a velikost 120 μm vnitřního průměru oocytu.

5.1.3 Kultivace oocytů

Před kultivací byly všechny COCs třikrát promyty v kultivačním mediu. Poté byly COCs přeneseny do čtyřjamkové destičky (Nunc, Roskilde, Denmark) s 1 ml modifikovaného kultivačního média obohaceného o lidský choriový gonadotropin (hCG) a koňský choriový gonadotropin (eCG) o poměru 13,5: 6,6 IU/ml, 5% bovinní fetální sérum. COCs byly rozděleny do jedné kontrolní skupiny a tří pokusných skupin. COCs pokusných skupin byly ošetřeny roztokem BPS o následujících finálních koncentracích: 300 pM, 30nM, 3 μM . Do média kontrolní skupiny byl přidán dimethylsulfoxid (DMSO) o stejné koncentraci 0,1 % jako u pokusných skupin. Kultivace probíhala po 48 hodin při teplotě 39 °C v 5 % CO₂ v atmosféře.

5.1.4 Western blot

Vzorky buněk pro metodu western blot byly zpracovány podle Tůmová et al. (2013) s menšími modifikacemi. Oocyty zbavené kumulárních buněk ve stadiu GV (200 oocytů

na vzorek) byly vloženy do 15 μ L lyzačního pufru. Stejný proces byl zopakován odděleně se získanými kumulárními buňkami. Vzorky byly povařeny při teplotě 100 °C po dobu pěti minut. Pro oddělení proteinů byla použita SDS – PAGE elektroforéza ve 12.5% separačním gelu. Standardy molekulových hmotností (Bio-Rad Laboratories, Walford, UK) byly použity pro zjištění hmotností detekovaných proteinů. Následovalo přetištění proteinů na nitrocelulozovou membránu (GE Healthcare, Amersham UK). Po noční blokaci ve 2% mléce v PBS s 0.1% Tween20 byla membrána inkubována po dobu 2 hodin s primárními protilátkami myší anti- α -tubulin o koncentraci 1:500 a králičí anti-MFN1 1:250. Následovalo promytí membrány po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě se sekundární kozí anti-myší IgG protilátkou o ředění 1:10000 a sekundární kozí anti králičí IgG protilátkou o ředění 1:40 000 (GE Healthcare). Vizualizace proteinů byla provedena pomocí ECL Select Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare) a přístroje ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad Laboratories, Steenvoorde, France).

5.1.5 Imunocytochemie

5.1.5.1 Lokalizace mitochondrií

Po odstranění kumulárních buněk byly oocyty přeneseny do čtyřjamkové destičky s naředěným barvivem MitoTracker red (0,5 ml kultivačního media a 0,2 μ M MitoTracker red na jednu jamku). MitoTracker red (M22425) je barvivo barvící živé buňky, z toho důvodu se přidává do kultivačního media před fixací buněk. Kultivace probíhala 10 minut při laboratorních podmínkách bez přístupu světla pod alobalovou clonou. Poté byly oocyty 4x propláchnuty v promývacím roztoku (Triton X-100 rozpuštěný v PBS-NaN₃ obohaceném o 1% NGS). Další krokem byla fixace oocytů v 4% roztoku paraformaldehydu v PBS (Phosphate buffered saline) po dobu 30 minut pod alobalovou clonou. Následuje buď uskladnění v PBS-NaN₃, nebo proplach v PBS-NaN₃ a barvení dalších struktur.

Druhým způsobem, který jsme používali pro lokalizaci mitochondrií, byla vizualizace MFN1. Začátek postupu se shoduje s postupem barvení α -tubulinu, viz níže. Inkubace oocytů probíhala s primární protilátkou králičí anti MFN1 (ab50843) o koncentraci 1:200 po dobu jedné hodiny. Následně byly oocyty 3x propláchnuty v promývacím roztoku a

kultivovány 40 minut se sekundární kozí anti králičí IgG protilátkou o ředění 1:200. Potom byly oocyty naposledy propláchnuty 3x v promývacím roztoku a montovány na podložní sklíčko s kapkou Vectashieldu obsahující 4',6-diamidino-2-fenyl indol dihydrochlorid (DAPI) pro vizualizaci chromatinu.

5.1.5.2 Lokalizace α -tubulinu

Po odstranění kumulárních buněk byly oocyty nejdříve fixovány 30 minut v 4% roztoku paraformaldehydu v PBS při laboratorní teplotě a propláchnuty v PBS-NaN₃. Do doby zpracování byly oocyty uskladněny při teplotě 4 °C. Následně byla provedena permeabilizace pro prostupnost membrán v 0,1 % Tritonu X-100 rozpuštěného v PBS-NaN₃ a blokace v Tritonu X-100 rozpuštěného v PBS-NaN₃ obohaceného o 5 % NGS po dobu půl hodiny. Dále byly oocyty inkubovány s primární protilátkou myší anti- α -tubulin (T6199) po dobu jedné hodiny o ředění 1:1000 v promývacím roztoku. Několik oocytů nebylo kultivováno s primární protilátkou pro vytvoření negativní kontroly. Po inkubaci byly oocyty 3x opláchnuty v promývacím roztoku. Takto připravené oocyty byly kultivovány se sekundární protilátkou kozí anti-myší IgG protilátkou konjugovanou s fluorescein-5-izothiokyanátem (FITC) ředěnou o poměru 1:200 v promývacím roztoku. Doba kultivace se sekundární protilátkou odpovídala 40 minutám. Poté byly oocyty opět 3x propláchnuty v promývacím roztoku. Nakonec byly oocyty montovány na podložní sklíčko s kapkou Vectashieldu obsahující 4',6-diamidino-2-fenyl indol dihydrochlorid (DAPI) pro vizualizaci chromatinu.

5.1.6 Tunel assay

Fixace oocytů proběhla klasickým způsobem v 4% roztoku paraformaldehydu v PBS. Oocyty byly dále permeabilizovány v 0,1% Triton X-100 v PBS s přídavkem 5 % NaN₃ po 30 minut. Dle návodu výrobce byl přidán fluorescein-konjugovaný s deoxyuridinosintrifosfátem (dUTP) a enzym terminální deoxynukleotidyl transferáza (TdT) (In Situ Cell Death Detection Kit, cat. No. 11684795910, Roche, Mannheim, Germany). Kultivace probíhala bez přístupu světla při 37 °C po dobu jedné hodiny. Posledním krokem byla montáž oocytů na podložní sklíčko s kapkou Vectashieldu s přídavkem DAPI.

5.1.7 Konfokální mikroskopie a analýza obrazu

Snímání připravených preparátů proběhlo na konfokálním mikroskopu Olympus IX83 (Olympus, Germany) při shodném nastavení pro všechny experimenty. Intenzita signálu byla měřena pomocí softwaru ImageJ. Intenzita signálu byla vyjádřena jako „relativní intenzita“ získaná poměrem mezi naměřenou průměrnou hodnotou intenzity v oocytech v dané experimentální skupině a průměrnou hodnotou intenzity oocytů ve skupině kontrolní.

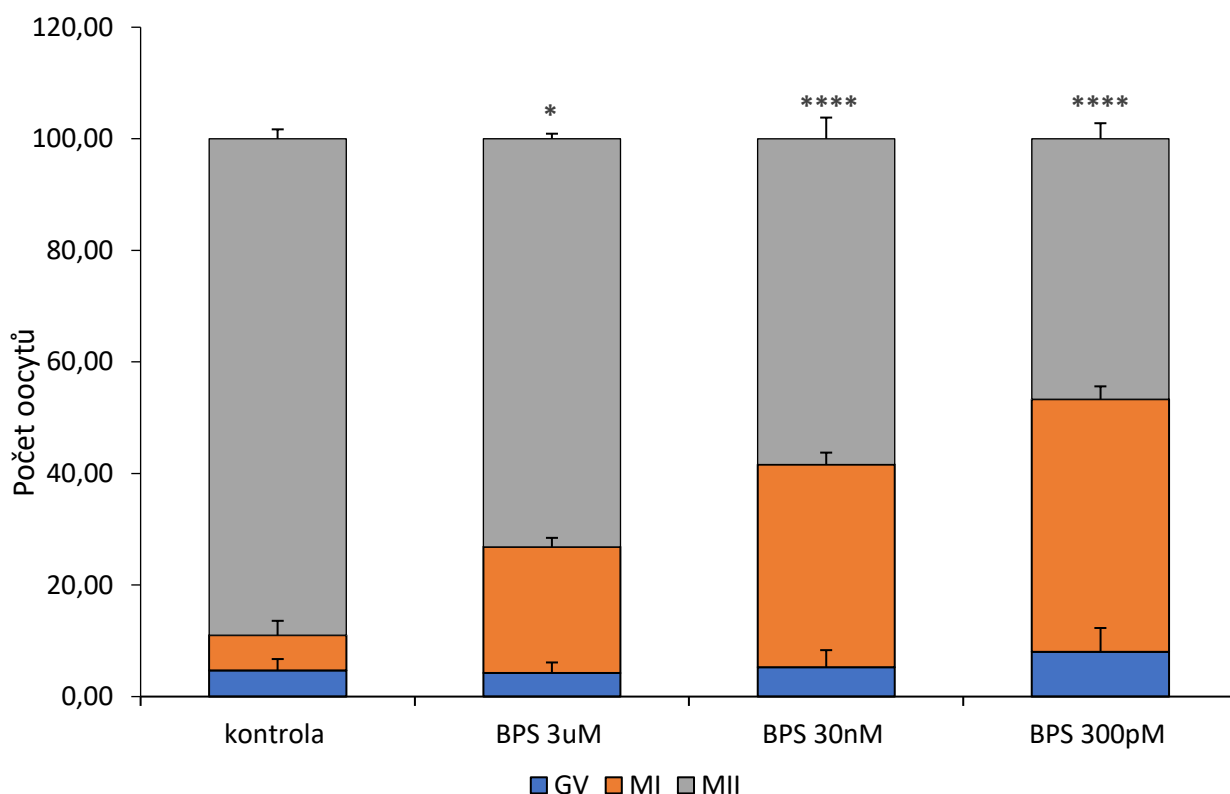
5.1.8 Statistická analýza

Data všech experimentů byla uvedena jako průměr \pm střední chyba průměru z minimálně tří nezávislých experimentů. Pro statistickou analýzu srovnávání mezi skupinami byl použit Fischerův exaktní test nebo Chí kvadrát test s Bonferroniho korekcí. Data byla zpracována pomocí programu Statistica Cz 12 (StatSoft, Inc., USA). Pokud byla P hodnota menší než 0,05, byl výsledek považován za statisticky významný.

6 Výsledky

6.1 Vliv BPS na průběh meiotického zrání

Cílem experimentu bylo zjistit účinky koncentrací BPS (300 pM, 30nM, 3μM) na průběh meiotického zrání prasečích oocytů *in vitro*. Po skončení 48hodinové kultivace bylo hodnoceno stadium meiotického zrání na základě morfologie chromatinu. Jak je znázorněno v grafu 1, velké procento oocytů ošetřených BPS se zastavilo ve vývojové fázi MI. Na rozdíl od kontrolní skupiny, kde všechny oocyty dosáhly stadia MII, kvantifikační analýza prokázala negativní vliv BPS na schopnost oocytů dosáhnout MII po 48 hodinách kultivace u všech testovaných koncentrací, viz graf 1. Nejvíce oocytů v MI fázi bylo pozorováno u koncentrací 300 pM a 30nM oproti 3μM a kontrolní skupině. Vliv BPS na progresi meiotickým zráním se v našem případě prokázal být lineárně závislý na dávce, přičemž největší efekt byl zaznamenán u nejnižší koncentrace potvrzující efekt nízké dávky.

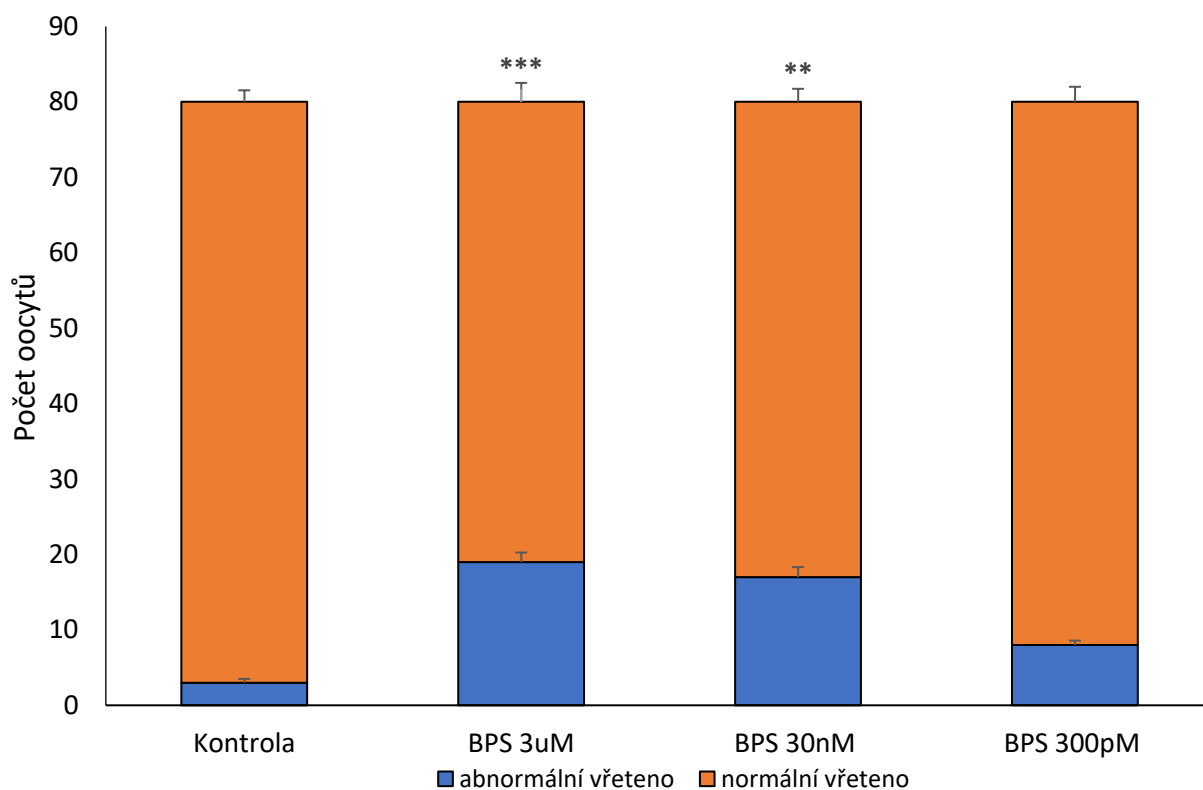


Graf 1: Efekt BPS na průběh meiotického zrání prasečích oocytů. GV – nezralý oocyt ve stadiu zárodečného váčku (germinal vesicle), MI – oocyt v metafázi prvního meiotického

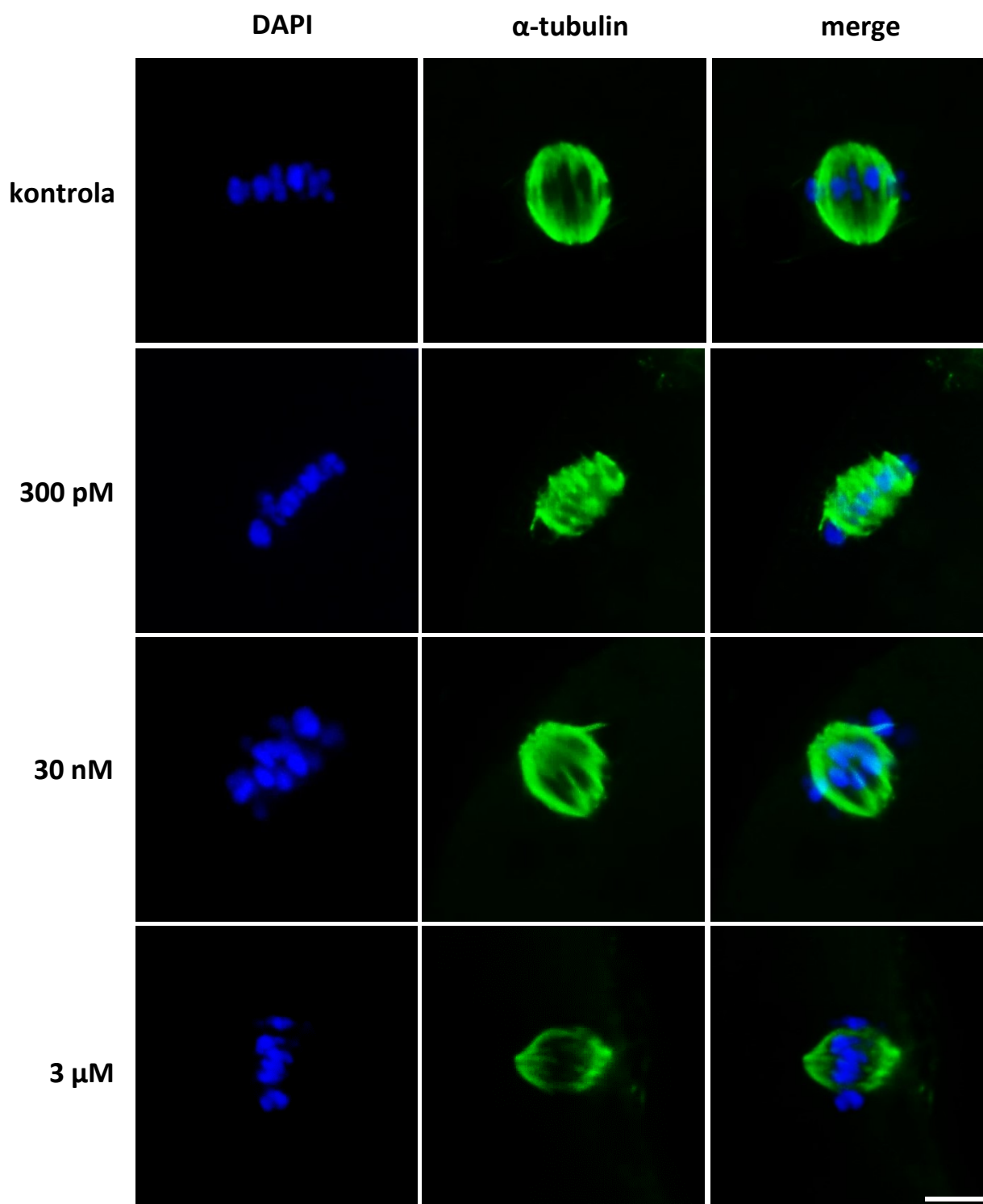
dělení, MII – oocyt v metafázi druhého meiotického dělení. Různá indexová označení popisují statistickou významnost mezi experimentálními skupinami ve stejném stadiu meiotického zrání ($P < 0,05$). Data jsou prezentována jako průměrné procento (průměr \pm střední chyba průměru) z nejméně pěti nezávislých experimentů, $n=30$ oocytů na skupinu.

6.2 Vliv BPS na utváření dělicího vřeténka v průběhu meiotického zrání

Formace meiotického vřeténka v metafázi II oocytů ošetřených BPS zrajících *in vitro* byla hodnocena ve druhém experimentu této práce. Malformace dělicího vřeténka a seřazení chromozomů v ekvatoriální rovině byly posuzovány na základě imunofluorescenčního barvení DNA a α -tubulinu. Oocyty v kontrolní skupině obsahovaly dělicí vřeténka s typickou válcovitou strukturou a seřazenými chromozomy. V oocytech kultivovaných v různých koncentracích BPS byly pozorovány některé typy defektů včetně výrazně menšího dělicího vřeténka, sníženého počtu tubulinových filament, chybného napojení tubulinu na chromozomy nebo póly dělicího vřeténka a protáhlé metafázní destičky s rozlehlými póly. Chybné seřazení chromozomů v ekvatoriální rovině nebylo pozorováno v takové míře jako defekty dělicího vřeténka. Poměr abnormálních dělicích vřetének vůči normálním byl po BPS ošetření signifikantně větší u 3 μ M a 30 nM testovaných koncentrací než u kontrolní skupiny, viz graf 2. V nejnižší koncentraci 300 pM nebyl naměřen statisticky významný rozdíl v poměru abnormálních vřetének oocytů vůči kontrolní skupině.



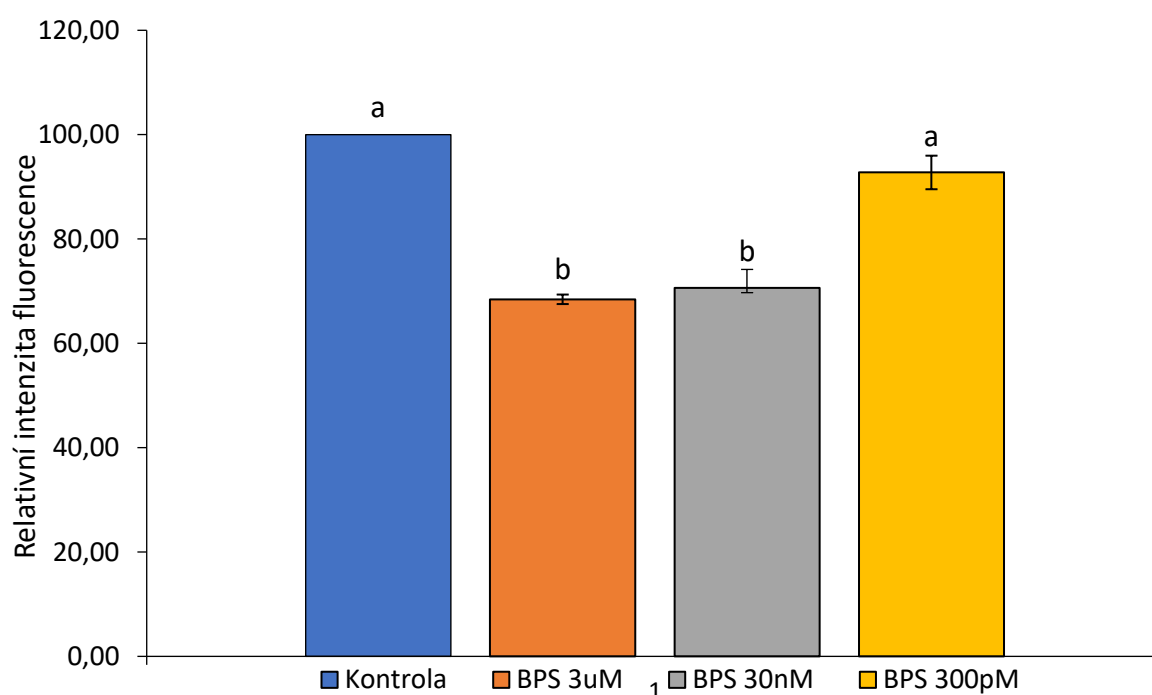
Graf 2: Poměr defektních vřeten proti standardním vřetenům po kultivaci s BPS v různých koncentracích. Různá indexová označení popisují statistickou významnost mezi experimentálními skupinami a kontrolní skupinou v počtu naměřených abnormálních dělicích vřeten ($P < 0,05$). Data jsou prezentována jako průměrné procento (průměr \pm střední chyba průměru) z nejméně pěti nezávislých experimentů, $n=25$ oocytů na skupinu.



Obrázek 4: Defekty v organizaci dělicího vřetene a seřazení chromozomů po 48 h kultivaci s BPS. Kontrola – bipolární vřeteno se zarovnanými chromozomy. 300 pM – dělicí vřeteno s nezacílenými póly. 30 nM – abnormální segregace chromozomů. 3 μ M – výrazné snížení velikosti a hustoty mikrotubulů vřetene. Měřítka u každého obrázku odpovídá 10 μ M.

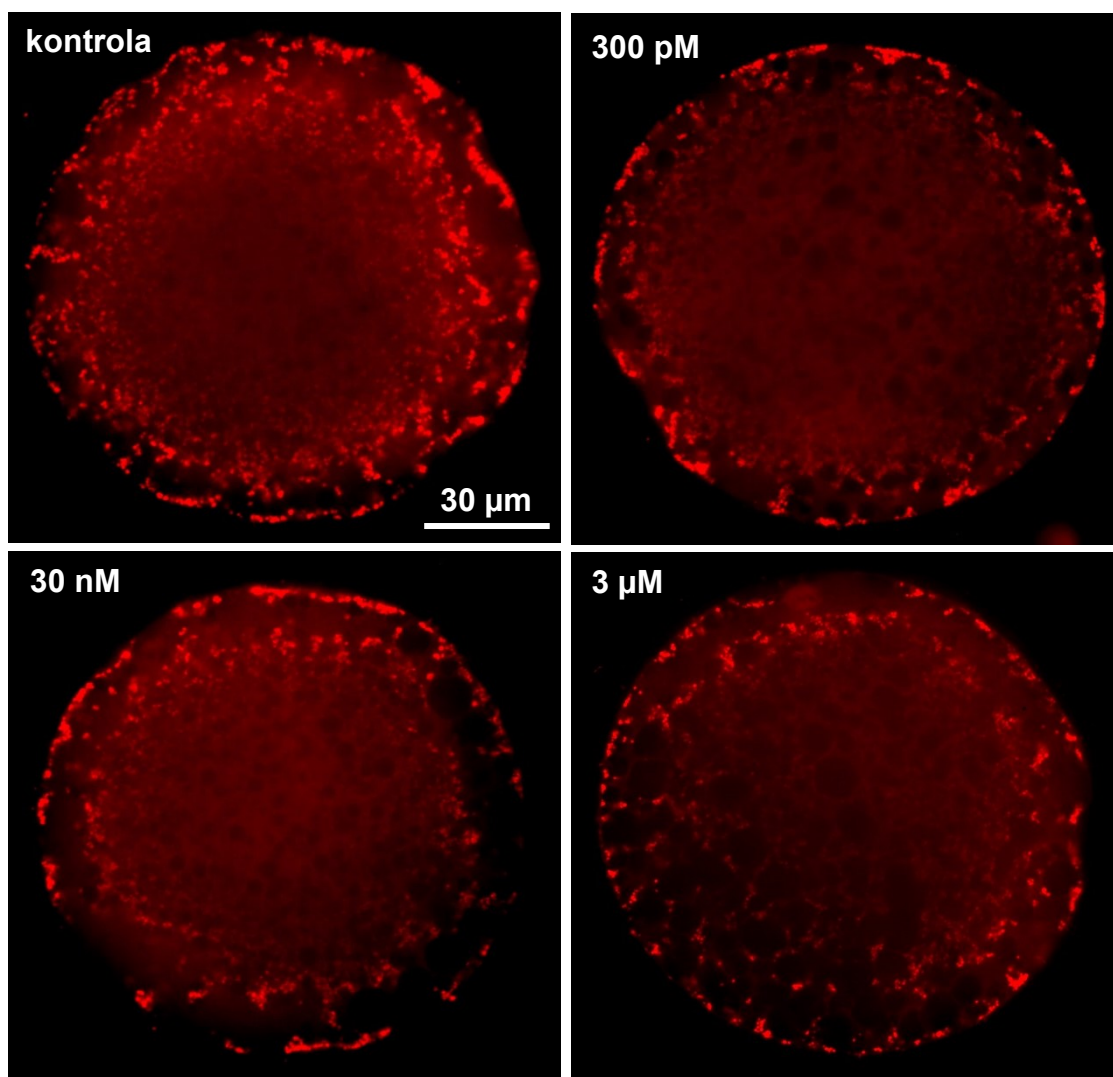
6.3 Vliv BPS na integritu mitochondrií v průběhu meiotického zrání

Cílem experimentu bylo vyhodnotit dopady expozice BPS na změnu relativní intenzity fluorescence mitochondrií v průběhu meiotického zrání. Za tímto účelem byly mitochondrie vizualizovány pomocí MitoTrackeru red, jehož intenzita signálu je přímo úměrná výši membránového potenciálu mitochondrií. Intenzita fluorescence mitochondrií byla měřena u oocytů v kontrolní skupině a oocytů ošetřených BPS o třech koncentracích (300 pM, 30nM, 3μM). Výsledky měření intenzity fluorescence odhalily výrazné snížení mitochondriálního signálu u oocytů kultivovaných v koncentracích 3μM a 30nM BPS oproti oocytům v kontrolní skupině. U oocytů ošetřených 300pM koncentrací BPS nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou, viz graf 2. Ze statistického zpracování dat vyplývá, že BPS narušuje mitochondriální aktivitu v lineární závislosti na koncentraci.



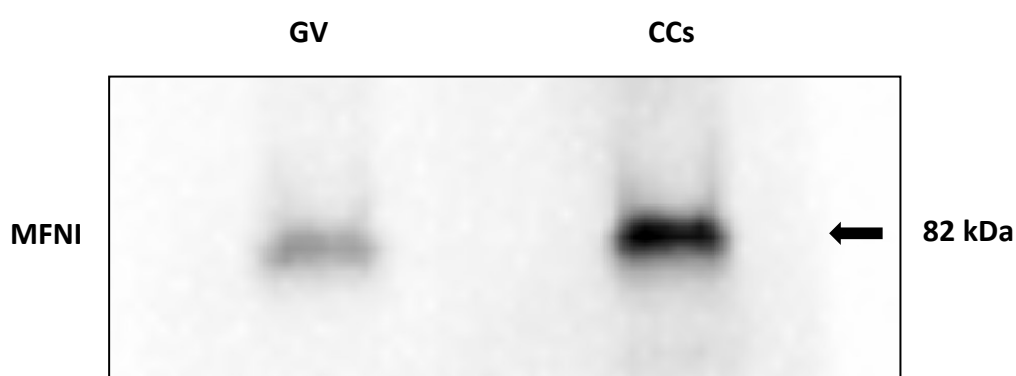
Graf 3: Relativní intenzita fluorescence mitochondrií po kultivaci oocytů s BPS. Různá indexová označení popisují statistickou významnost mezi experimentálními skupinami v naměřené relativní intenzitě fluorescence ($P < 0,05$). Data jsou uvedena jako průměrné

procento (průměr \pm střední chyba průměru) z nejméně tří nezávislých experimentů, n=30 oocytů na skupinu.

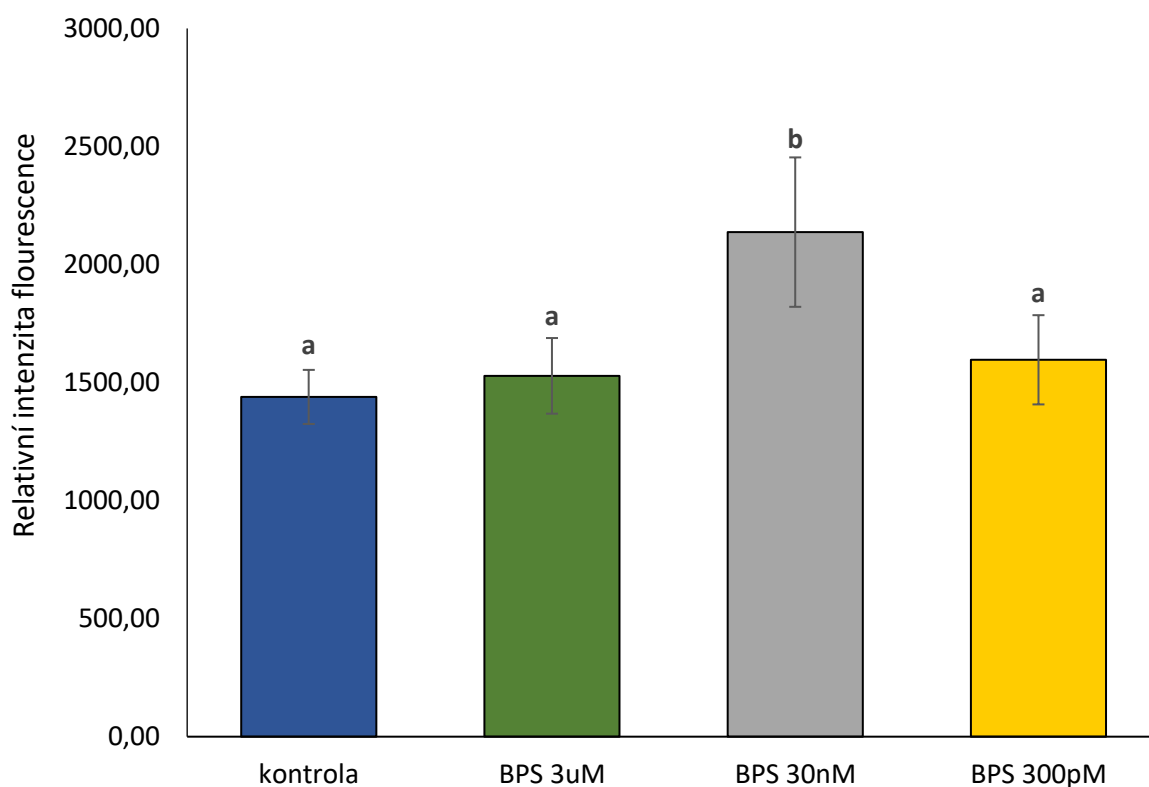


Obrázek 5: Imunocytochemické barvení mitochondrií v MII oocytech MitoTrackerem red zobrazující integritu a rozložení mitochondrií. Kontrola – mitochondrie jsou lokalizovány subkortikálně a kortikálně. 300 pM, 30 nM, 3 μ M – převládá kortikální rozložení mitochondrií. Měřítka u každého obrázku odpovídá 30 μ M.

V druhé části experimentu jsme mitochondrie vizualizovaly pomocí imunofluorescence MFN1. Intenzita fluorescence mitochondrií byla měřena u oocytů v kontrolní skupině a oocytů ošetřených BPS o třech koncentracích (300 pM, 30nM, 3μM). Významný nárůst intenzity fluorescence oproti kontrolní skupině byl detekován pouze u skupiny oocytů vystavené střední koncentraci 30 nM. Oocyty ošetřené v koncentracemi 3 μM a 300pM nevykazovaly významný nárůst intenzity fluorescence MFN1 v porovnání s kontrolní skupinou, viz Graf 4. Účinek BPS byl nelineárně závislý na dávce. Metoda western blot byla provedena pro ověření specifity protilátky MFN1.

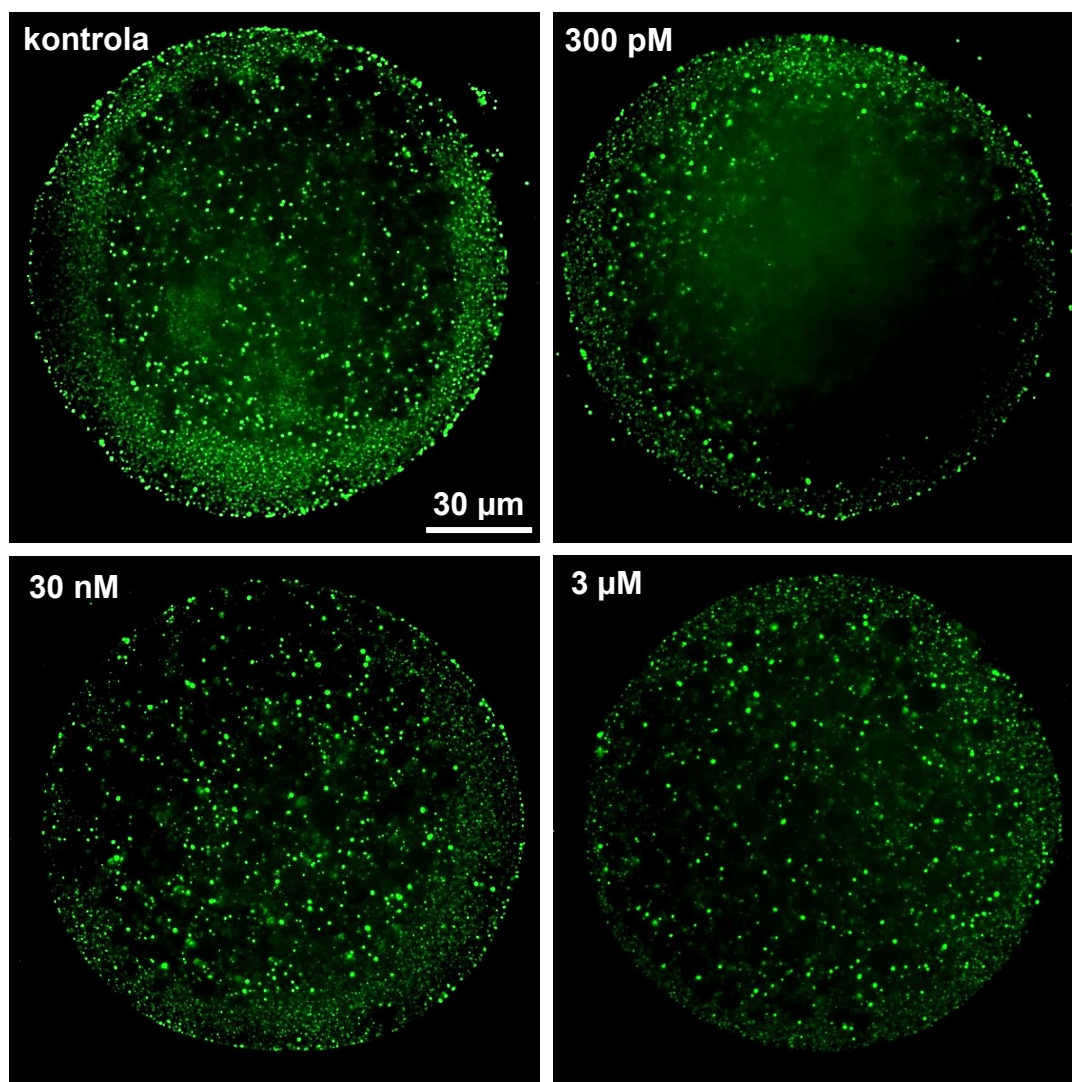


Obrázek 6: Detekce MFN1 pomocí metody Western blot v meioticky kompetentních oocytech. GV – oocyty ve stadiu zárodečného váčku. CCs – kumulární buňky (cumulus cells). MFN1 byl zjištěn o velikosti 82 kDa, n= 150 oocytů.



Graf 4: Relativní intenzita fluorescence MFN1 po kultivaci oocytů ošetřených BPS.

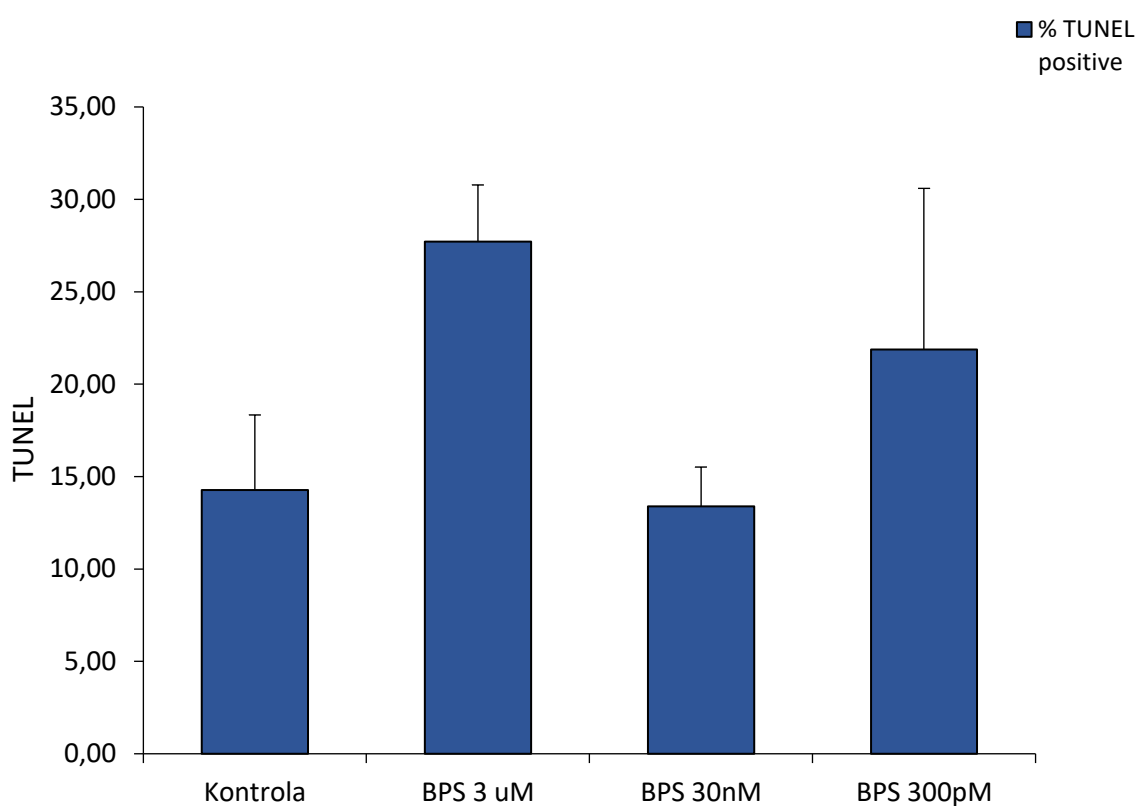
Různá indexová označení popisují statistickou významnost mezi experimentálními skupinami v naměřené relativní intenzitě fluorescence ($P < 0,05$). Data jsou uvedena jako průměrné procento (průměr \pm střední chyba průměru) z nejméně tří nezávislých experimentů, $n=25$ oocytů na skupinu.



Obrázek 7: Imunocytochemické barvení MFN1 v MI oocytech zobrazující integritu a rozložení mitochondrií. Kontrola, 300pM – mitochondrie jsou lokalizovány subkortikálně a kortikálně. 30 nM, 3 μ M – rozložení mitochondrií je disperzní. Měřítka u každého obrázku odpovídá 30 μ M.

6.4 Vliv BPS na chromatinovou integritu během meiotického zrání

Cílem tohoto experimentu bylo vyhodnotit integritu DNA v MII oocytech ošetřených BPS *in vitro*. Pro posouzení integrity DNA byla použita metoda TUNEL analyzující dvouřetězcové zlomy DNA. Zvýšený TUNEL pozitivní signál indikující DNA fragmentaci byl zaznamenán ve skupinách oocytů kultivovaných v 300 pM a 3 μ M koncentracích BPS. Nicméně nebyl prokázán jako statisticky významný.



Graf 5: DNA fragmentace v MII oocytech po expozici BPS. Data jsou prezentována jako průměrné procento (průměr \pm střední chyba průměru) z nejméně tří nezávislých experimentů, n=20 oocytů na skupinu.

7 Diskuze

Hlavním účelem této práce je zjištění účinku BPS na vybrané proteiny meiotického zrání prasečích oocytů. Prase je vhodný modelový organismus jelikož sdílí podobné anatomické a fyziologické charakteristiky s člověkem (Groth, 2007). Prase domácí je čím dál tím častěji používaný modelový organismus pro studium reprodukce lidí z důvodů podobného průběhu oogeneze a raného embryonálního vývoje. Nejvíce patrné shody jsou v načasování meiotického zrání oocyty, aktivaci embryonálního genomu (4 buněčné embryo u lidí, 4-8 buněčné embryo prasat) a dosažení fáze blastocysty (Wehrend a Meinecke, 2001a). Z toho důvodu lze výsledky této práce vztáhnout na lidskou reprodukci.

Testované koncentrace BPS (300 pM, 30nM, 3μM) jsme zvolili na základě předběžných výsledků měření přítomnosti BPS ve folikulární tekutině pacientek IVF centra (data nejsou zobrazena). Průměrná naměřená hodnota odpovídá přibližně 30nM, zbylé dvě hodnoty jsme určili o řád vyšší a nižší. Použité koncentrace BPS odpovídají reálným expozicím oocytů člověka v podmínkách *in vivo*. V této práci jsme experimentálně testovali hypotézu, podle které dochází k narušení průběhu meiotického dělení a poškození maturace oocytů expozicí BPS. Pro objasnění hypotézy jsme zkoumali efekt BPS v procesu formace dělicího vřeténka, sledování integrity mitochondrií a míry poškození DNA.

Bezchybný průběh meiotického zrání oocytů je podmínkou produkce vývojově kompetentních oocytů a úspěšného embryonálního vývoje. Obecně, průběh maturace oocyty je velice složitý proces zahrnující mnoho na sobě závislých faktorů a narušením jejich signalizačních drah se může meiotické zrání zastavit. Primární výsledek prokazuje negativní efekt vlivu BPS na progresi buněčného cyklu během maturace oocytů *in vitro*. Účinky BPS na meiotické zrání byly vyhodnoceny po 48hodinové kultivaci oocytů, po ukončení kultivace se část oocytů nacházela v MII fázi. Nicméně signifikantní množství oocytů vystavených BPS dosáhlo po 48 h kultivaci pouze MI fáze. Efekt byl sledován ve všech použitých koncentracích (300 pM, 30nM, 3μM) s lineární závislostí na dávce. V tomto experimentu byl naměřen nejsilnější efekt BPS o nejnižší koncentraci (300pM). Výsledek potvrzuje schopnost endokrinních disruptorů dosahovat větších účinků ve

velmi nízkých koncentracích (tzv. efekt nízké dávky), viz kapitola endokrinní disruptory. Předchozí studie naší laboratoře zkoumala účinek tří koncentrací BPS (3 nM, 300 nM, a 30 μ M). Účinek BPS v nejnižší použité koncentraci 3 nM byl potvrzen jako statisticky významný (Žalmanová et al., 2017). Současná studie uvádí efekt BPS v ještě menší koncentraci 300 pM. Pokud víme, tak doposud nebyly pozorovány účinky BPA na maturaci savčích oocytů v analogických koncentracích. Obdobný efekt BPS na průběh meiotického zrání potvrdila *in vivo* studie pracující se samicemi myši vystavených dlouhodobým dávkám BPS simulujícím reálný výskyt v prostředí (Nevoral et al., 2018). Naopak k rozdílnému výsledku dospěl Campen et al. (2018), jehož tým nezaznamenal významný negativní efekt BPS na progresi bovinních oocytů do MII fáze *in vitro*. Rozdíl v dopadu na meiotické zrání může odrážet rozdíly ve specifickém načasování meiotické progresy mezi živočišnými druhy, a proto i v citlivosti na endokrinní disruptory, např. GVBD nastane do 2 h od *in vitro* maturace u myších oocytů (Downs et al., 1988), do 6 h u bovinních oocytů (Sirard et al., 1989) a do 22 h v prasečích oocytech (Wehrend a Meinecke, 2001). Podobné účinky sledované v naší studii byly pozorovány po vystavení prasečích oocytů různým koncentracím BPA (Wang et al., 2016). V lidských oocytech byl potvrzen totožný efekt BPA na narušení meiotické progresy oocytů (Machtinger et al., 2013). Výzkumná skupina Can et al. (2005) hodnotila vliv BPA na myší oocyty v různých časových intervalech meiotického zrání. Nejvíce zastavených oocytů bylo zjištěno v přechodu mezi metafází I a anafází I, na rozdíl od následujícího přechodu z anafáze I do telofáze I. Je známo, že v mitóze a meióze závisí začátek anafáze na degradaci cyklinu zprostředkovanou ubikvitinem-proteasomovým komplexem a regulačních faktorech MPF a MAPK (Sun et al., 1999). Když vezmeme v úvahu, že jednoduchou inhibicí proteáz způsobíme zastavení buněčného cyklu v metafázi (Sherwood et al., 1993), je jedním z potenciálních mechanismů působení BPS inhibice degradace cyklinů v průběhu meiotického dělení. Hlavním substrátem MAPK je kináza p90rsk regulující postup oocytu buněčným cyklem, tj. inaktivací inhibitoru MPF MYT1. Z toho důvodu může být kináza p90rsk nebo další komponenty signální dráhy cílem inhibice BPS.

Jedním z neméně podstatných procesů ovlivňujících progresi oocytu meiotickým zráním je formace dělicího vřeténka viz Lee (et al., 2000), kapitola jaderné zrání. Dělicí vřeténko a obecně celý buněčný cytoskelet jsou vhodnými buněčnými markery vzhledem k jejich

citlivosti na enviromentální toxiny (Hunt et al., 2003). V našem experimentu měla kultivace COCs ve všech koncentracích BPS za následek výskyt většího počtu abnormálních dělicích vřeten v MII oocytech. Pozorované abnormality byly: zploštělé vřeténko s rozlehlými póly, snížený počet tubulinových filament, chybné napojení tubulinů na chromozomy a póly dělicího vřetena, či menší velikost vřeténka. Abnormální formace vřeténka způsobila v některých případech také nepravidelné seřazení chromozomu v metafázní destičce. Podobných výsledků bylo dosaženo v *in vivo* studii na myších oocytech, kde byly zaznamenány malformace dělicího vřeténka a chybné seřazení chromozomů v ekvatoriální rovině u všech testovaných skupin BPS, což vedlo k nadměrnému množství abnormálních oocytů (Nevoral et al., 2018). Naše pozorování bylo potvrzeno výzkumem Campen et al. (2018), který sledoval vliv BPS na morfologii dělicího vřeténka v bovinních oocytech. Morfologické dysfunkce dělicího vřeténka byly pozorovány v oocytech ve fázi MII téměř ve všech koncentracích s nelineární závislostí. Speciální formace zploštělého vřeténka s rozlehlými póly byla rovněž pozorována ve studii Campen et al. (2018), avšak pouze v oocytech kultivovaných ve vysokých koncentracích BPS (100 nM). V lidských oocytech byla zploštělá formace vřeténka s rozlehlými póly spojena s defektním uspořádáním chromozomů v metafázní rovině (Coticchio et al., 2013). Pozorované výsledky účinků BPS v našem experimentu odpovídaly výzkumu vlivu BPA na formaci dělicího vřeténka v prasečích oocytech. Studie Wang et al. (2016) prokázala negativní působení BPA na vydělení polárního tělíska a celkovou progresi zrání prasečích oocytů *in vitro*. V pokusných oocytech byl pozorován větší výskyt abnormálních dělicích vřetének spolu s deformovanými mikrotubuly. Efekt byl potvrzen poklesem fosforylované MAPK. Obdobných výsledků vlivu BPA bylo dosaženo v *in vivo* a *in vitro* studiích na myších oocytech (Can et al., 2005; Eichenlaub-Ritter et al., 2008). Zajímavým porovnáním byla síla účinku BPS a BPA na organizaci dělicích vřeten. U oocytů ošetřených BPS byl pokles normálních bipolárních vřeten o 64%, u BPA jen o 34% (Campen et al., 2018). Takovéto výsledky naznačují rozdílné působení obou chemikálií, konkrétně vyšší účinek BPS na formaci dělicího vřeténka. Rozdílný efekt dvou analogických látek může vznikat díky odlišným reakcím s již perzistujícími chemikáliemi v organizmu a jejich vzájemné působení. Obecně individuální rozdíly v metabolismu a látkovém složení těla jednotlivců mohou vytvářet značnou

variabilitu v účincích EDs, stejně tak v jejich akumulaci či degradaci v tělesných tekutinách a tkáních (Vandenberg et al., 2012).

Přesný mechanismus působení BPA nebo BPS na uspořádání meiotického dělicího vřeténka je neznámý a nejspíše se odehrává na více úrovních. Jednou z možností je přímá vazba na tubulin. Lehmann a Metzler (2004) pozorovali ireverzibilní vazbu BPA na tubulinová vlákna, jež způsobila tvorbu speciálních tubulinových konformací v lidských fibroblastech. Dalším potenciálním mechanismem působení BPA/BPS je dezorganizace meiotických MTOCs, což následně vede k chybám v organizaci mikrotubulů. Například nadměrná exprese PCNT nebo lokalizace PCNT mimo MTOCs vedla k defektům dělicího vřeténka a aneuploidii (Pihan et al., 2001). V rozsáhlé studii Can et al. (2005) pozorovali rozmístění PCNT kolem MTOCs v cytoplasmě či malá ohniska PCNT nukleující mikrotubuly nezávisle na dělicím vřeténku v myších oocytech po ošetření BPA. Podobný efekt byl zaznamenán také u BPS. Po expozici BPS se PCNT vyskytoval v několika případech abnormální lokalizaci mimo póly vřeténka v myších oocytech (Nevoral et al., 2018). Defekty v sestavení vřeténka či špatné napojení mikrotubulu ke kinetochoře aktivují proteiny kontrolního bodu napojení dělicího vřeténka (SAC, spindle assembly checkpoint). BPA v dělicích se somatických buňkách prodlužoval mitotickou progresi aktivací SAC a rozrušováním napojení mikrotubulů ke kinetochorám (Kim et al., 2019). Na základě výsledků výše uvedených studií lze konstatovat, že BPS může ovlivňovat organizaci dělicího vřeténka několika způsoby, a to přímou vazbou na tubulin či rozrušováním proteinů lokalizujících se v MTOCs. Případnou aktivací SAC může BPS působit na zastavení meiotického dělení v přechodu mezi metafází a anafází.

V průběhu zrání oocyty dochází k významnému zvýšení membránového potenciálu, což odráží intenzivní oxidativní metabolismus (Van Blerkom et al., 1995). Dalším cílem této práce bylo zjištění exprese mitochondrií detekcí membránového potenciálu po kultivaci v různých koncentracích BPS. Oocyty kultivované v 3 μ M a 30nM koncentracích BPS vykazovaly významně sníženou relativní intenzitu fluorescence mitochondrií oproti kontrolní skupině. Překvapivě málo studií se věnuje účinku BPA a BPS na mitochondriální integritu oocytů. Za tímto účelem dále diskutuji důsledky nedostatku ATP v oocytech během fáze zrání, jenž s narušenou integritou mitochondrií úzce souvisí. Výzkumná skupina Brevini et al. (2005) zkoumala korelaci mezi vývojovou kompetencí prasečích

oocytů a mírou aktivity mitochondrií *in vitro*. Na konci *in vitro* kultivace nebyl zaznamenán rozdíl v obsahu ATP mezi oocyty s vysokou a nízkou vývojovou kompetencí. Oproti tomu Nagano et al. (2006) ve své studii pozorovali výrazně větší procento úspěšnosti oplození a dosažení fáze blastocysty u bovinních oocytů s vyšší hladinou vyprodukované ATP. Vliv obsahu ATP v oocyty na vývojovou kompetenci byl prokázán na lidských oocytech měřením úspěšnosti IVF implantace. Přesněji, byla naměřena minimální koncentrace 2 pmol ATP/oocyt pro dosažení fáze MII, následného oplození a úspěšné implantace (Blerkom et al., 1995). Snížený membránový potenciál koreluje s nedostatkem ATP pro procesy meiotického zrání a může vést k zastavení vývoje oocyty. Ve studii Jia et al. (2019) naměřili signifikantní pokles obsahu ATP v prasečích oocytech po kultivaci s endokrinním disruptorem fluoren-9-bisefnolem (analog BPA) a zároveň signifikantního množství zastavených oocytů v MI fázi. Z výsledků vyvozujeme potenciální vliv BPS na inhibici meiotického zrání prostřednictvím snižování obsahu ATP.

Rozložení mitochondrií pravděpodobně odráží místní požadavky na ATP v průběhu zrání oocyty. Z toho důvodu je změna distribuce vhodný indikátor kvality oocyty, což bylo prokázáno u několika živočišných druhů včetně člověka (Wilding et al., 2001b). Z výsledků této práce jsme zaznamenali model rozložení mitochondrií po 48hodinové kultivaci oocytů v BPS. Naše pozorování MII oocytů v kontrolních skupinách indikovalo subkortikální rozložení mitochondrií. Pokusné skupiny oocytů disponovaly častějším kortikálním rozložením mitochondrií než subkortikálním (data nejsou zobrazena). Pravděpodobné vysvětlení subkortikálního rozložení mitochondrií je potřeba ATP a zvýšení hladiny intracelulárního vápníku u kortexu buňky po oplození oocyty. Podobná distribuce mitochondrií v MII oocytech byla potvrzena ve dvou studiích na prasečím modelu (Pawlak et al., 2012; Cui et al., 2019). Nicméně názory o rozmístění mitochondrií ve zralých prasečích oocytech se mezi studii liší. Dle výzkumu Brevini et al. (2005) jsou mitochondrie na konci fáze zrání rozmístěny po oocyty disperzně. Rozdílné výsledky mohly být způsobeny odlišným způsobem kultivace či metodikou barvení mitochondrií. Brevini et al. (2005) dále popsali spojitost mezi nepatrným až žádným pohybem mitochondrií a nízkou vývojovou kompetencí oocytů. Většina studií se shoduje na tom, že nedostatečný pohyb mitochondrií v ooplasmě během meiotického zrání koreluje s nízkou vývojovou kompetencí (Sun et al., 2001). Pohyb mitochondrií do různých

kompartmentů buňky je závislý na mikrotubulech a membránové fúzi mitochondrií (Sun et al., 2001a). Otázkou je, zda nedostatečná distribuce mitochondrií během zrání oocytů je následkem defektu ve fúzních proteinech MFN1 a MFN2 mitochondrií, nebo narušení polymerace mikrotubulární sítě. Efekt endokrinních disruptorů na cytoskelet byl již mnohými studiemi prokázán, viz výše. V každém případě víme, že působení endokrinních disruptorů je komplexní, a proto se může jednat o kombinaci defektů jak v polymeraci mikrotubulů, tak ve fúzních proteinech.

Jak bylo řečeno, funkční proteiny MFN1 a MFN2 se uplatňují v mitochondriální fúzi. Kromě toho se také podílí na regulaci membránového potenciálu mitochondrií, více viz Schneeberger (et al., 2013), kapitola cytoplasmatické zrání. Zajímavým zjištěním dílčích výsledků třetího experimentu byl signifikantní nárůst intenzity fluorescence membránového proteinu mitochondrií MFN1 v oocytech po vystavení 30 nM koncentraci BPS oproti oocytům v kontrolní skupině. Statisticky významný nárůst intenzity fluorescence nebyl prokázán u 3 μ M a 300 pM koncentracích BPS. Takovéto výsledky podporují hypotézu nemonotónního působení endokrinních disruptorů.

Ve studii Santel a Fuller (2001) měla nadměrná exprese MFNs v lidských trasfekovaných buňkách za následek masivní shlukování mitochondrií, které avšak v našem experimentu pozorováno nebylo, naopak mitochondrie oocytů v poskusných skupinách se distribuovaly spíše disperzně. Vliv nadměrné exprese MFN1 či MFN2 na kvalitu savčích oocytů nebyl doposud zkoumán. Nicméně několik studií potvrdilo jejich nezbytnost pro správný průběh oogeneze po cílené deleci *Mfn1* a *Mfn2* v savčích oocytech. Knock-out genu *Mfn1* u samic myší způsobil mitochondriální dysfunkce a změnu dynamiky mitochondrií v oocytech. Dále u samic myší docházelo k zastavení vývoje zralých oocytů a vyčerpání folikulárních rezerv ve vaječnících (Zhang et al., 2019).

Estrogeny mají regulační funkci v řadě mitochondriálních procesů, např. produkce ATP, ustálení membránového potenciálu, homeostázi vápníku a na mitochondriálně zprostředkovanou apoptózu. Regulační role estrogenů je potvrzená lokalizací ER β na mitochondriální membráně, čímž se spouštějí negenomické signální dráhy (Yang et al., 2004). Výzkumná skupina Sastre-Serra et al. (2012) kultivovala buněčnou linii odvozenou od rakoviny prsu s 17 β -estradiolem. Po ukončení kultivace byla naměřená vyšší hladina fúzních proteinů mitochondrií mimo jiné MFN1, naopak snížená hladina proteinů

zodpovědných za štěpení mitochondrií (Drp1). Nerovnováha mezi fúzními a štěpícími proteiny může mít vliv na mitochondriální integritu. Domníváme se, že zvýšená intenzita fluorescence MFN1 v našem experimentu je důsledek negenomické signalizace spuštěné vazbou BPS na estrogení receptory na mitochondriální membráně. Výsledkem BPS spuštěné signalizace může být aktivace GTPázové vazebné domény MFN1. Je prokázáno, že mitochondrie reagují na zvýšený metabolický nebo enviromentální stres fúzí membrán, která umožňuje spojení obsahu mitochondrií a zmírnění dysfunkcí spojených se stresem (Youle a van der Bliek, 2012). Výsledky naší studie naznačují možnost, že oocyty vystavené BPS reagují podobným způsobem. Další potencionálním mechanismem může být vliv BPS na regulaci translace MFN1 transkriptů v cytoplasmě.

Předpokladem posledního experimentu je vliv BPS na vznik DNA dvouvláknových zlomů (DSB, DNA double-strand breaks). Integrita chromatinu byla hodnocena na základě kvantifikace DSB. V experimentu nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl fluorescence, který by indikoval DNA fragmentace u žádné z použitých koncentrací BPS. K rozdílnému závěru došla *in vivo* studie na myších samicích, kterým byl naměřen významný nárůst DNA fragmentace metodou TUNEL v oocytech po akutní sedmidenní expozici BPS (Prokešová et al., 2020). Odlišné výsledky zkoumání vlivu BPS na chromatinovou integritu mají nejspíše příčinu v rozdílném systému expozice a použití řádově odlišných koncentrací, v našem případě ve výrazně nižší. Efekt endokrinního disruptoru fluoren-9-bisefnol na DSB byl doložen v nedávné studii na savčích oocytech za použití imunofluorescenčního barvení ohnisek γ -H2AX detekujícího DNA zlomy, zároveň ve stejné studii byla v oocytech naměřena vyšší hladina ROS (Jia et al., 2019). V zárodečné linii buněk *C. elegans* docházelo ke vzniku DSB narušením chromozomových synapsí v profázi I po ošetření BPA (Allard a Colaiacovo, 2010). Závěry *in vitro* studie na myších ovarích potvrdily působení BPA na tvorbu DNA zlomů a aktivaci ATM signalizační dráhy opravy DBS (Ganesan a Keating, 2016).

ROS vyprodukované v důsledku endogenního metabolismu, či eventuálně po expozici enviromentálním toxinům představují přední činidla poškozující DNA. Kromě přímého účinku působí ROS na DNA také nepřímo prostřednictvím reakcí s lipidy, proteiny a dalšími buněčnými složkami (Yu et al., 2016). Přestože nebyl vliv BPS na tvorbu DNA

zlomů této práci potvrzen, domníváme se na základě výsledků výše uvedených studií, že BPS působí na tvorbu DBS nepřímo prostřednictvím navýšení hladiny ROS.

Výsledkem práce je prokázáný vliv BPS ve velmi nízkých dávkách, jehož účinky se v mnoha směrech podobají BPA. Zjistili jsme negativní vliv BPS na progresi meiotického cyklu s lineární závislostí na dávce. Účinek BPS na organizaci dělicích vřeten byl v této práci také potvrzen. Dále se domníváme, že BPS snižuje aktivitu mitochondrií v oocytech zrajících *in vitro*. Dále předpokládáme, že BPS snižuje aktivitu mitochondrií v oocytech zrajících *in vitro*. Právě narušení dělicího vřetene a snížení aktivity mitochondrií může být důvodem zastavení meiotického zrání. Na druhou stranu jsme zaznamenali nárůst exprese membránového proteinu mitochondrií MFN1. Objasnění molekulárního mechanismu působení BPS na aktivitu a integritu mitochondrií v oocytech vyžaduje další výzkum v této oblasti, který má velký význam pro objasnění zmíněných procesů v oogenezi. Vliv BPS na integritu chromatinu nebyl v mé práci prokázán. Porovnáme-li výsledky všech experimentů, je zřejmé, že BPS působí na různé proteiny a procesy meiotického zrání v různých koncentracích. Takováto konsekvence svědčí o komplexním spektru účinků BPS. Limitním faktorem práce se může zdát její provedení *in vitro*, jelikož působení endokrinních disruptorů *in vitro* nemusí přesně reflektovat jejich *in vivo* aktivity. Nicméně po *in vitro* ošetření prasečích oocytů a *in vivo* u myších oocytů byly pozorovány podobné účinky BPS, což naznačuje, že pozorované defekty vyvolané BPS nejsou arteficiální a BPS takto působí na savčí oocyty obecně – nezávisle na podmínkách *in vivo* či *in vitro* a nezávisle na použitém živočišném modelu. To zvyšuje význam těchto studií pro humánní reprodukční medicínu. Navíc prasečí model pro *in vivo* experimenty je téměř nedostupný. Na druhou stranu vzhledem k své podobnosti s lidským oocytem je lepším modelem pro *in vitro* meiotické zrání než myší modelový organizmus. Přesto je v této oblasti potřeba detailnějšího výzkumu mechanismů endokrinních disruptorů, zvláště pak zaměření na studium analogů BPA.

8 Závěr

V závěrečné práci jsme testovali hypotézu negativního vlivu BPS na průběh meiotického zrání prasečích oocytů *in vitro*.

- Na základě výsledku prvního cíle jsme potvrdili negativní vliv nízkých dávek BPS na průchod oocytu meiotickým zráním a vytvoření zralého oocytu schopného oplození v metafázi II. V experimentu byl naměřen nejsilnější účinek v nejnižší použité koncentraci 300 pM, prokazující efekt nízké dávky endokrinních disruptorů.
- Získaná data v druhém experimentu potvrdila efekt BPS v nejvyšší 3 μ M a střední 30 nM testovaných koncentracích na formaci dělicího vřeténka s lineární závislostí na dávce.
- Expozice BPS způsobila snížení relativní intenzity fluorescence mitochondrií s lineární závislostí na dávce. Domníváme se, že BPS má negativní vliv na membránový potenciál a aktivitu mitochondrií v průběhu zrání oocytů *in vitro*. Vystavení oocytů 30 nM koncentracím BPS vedlo k nárůstu exprese fúzního proteinů mitochondrií.
- Oocyty ošetřené koncentracemi BPS neobsahovaly významně více DNA zlomů než oocyty v kontrolní skupině.

9 Seznam použité literatury

- ACTON B. M., JURISICOVA A., JURISICA I. a CASPER R. F., 2004. Alterations in mitochondrial membrane potential during preimplantation stages of mouse and human embryo development. *Molecular Human Reproduction* 10(1), 23–32.
- ALLARD P. a COLAIACOVO M. P., 2010. Bisphenol A impairs the double-strand break repair machinery in the germline and causes chromosome abnormalities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(47), 20405–20410.
- ANDERSON E. a ALBERTINI D. F., 1976. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *The Journal of Cell Biology* 71(2), 680–686.
- ANGER M., KUES W. A., KLIMA J., MIELENZ M., KUBELKA M., MOTLIK J., et. al, 2003. Cell cycle dependent expression of Plk1 in synchronized porcine fetal fibroblasts. *Molecular Reproduction and Development* 65(3), 245–253.
- BACHVAROVA, ROSEMARY F., 1992. A maternal tail of poly(a): The long and the short of it. *Cell*. 69(6), 895–897.
- BAKER, T. G., 1963. A QUANTITATIVE AND CYTOLOGICAL STUDY OF GERM CELLS IN HUMAN OVARIES. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Science*. 158, 417–433.
- BARRITT J., KOKOT M., COHEN J., STEUERWALD N. a BRENNER C., 2002. Quantification of human ooplasmic mitochondria. *Reproductive BioMedicine Online* 4(3), 243–247.
- BEKER A. R. C. L., COLENBRANDER B. a BEVERS M. M., 2002. Effect of 17 β -estradiol on the in vitro maturation of bovine oocytes - ScienceDirect. [vid. 2020-01-15].
- BEN MAAMAR M., LESNÉ L., DESDOITS-LETHIMONIER CH., COIFFEC I., LASSURGUÈRE J., LAVOUÉ V., DECEUNINCK Y., ANTIGNAC J., LE BIZEC B., ERDU E., ZALKO D., PINEAU CH., et. al. 2015. An investigation of the endocrine-disruptive effects of bisphenol a in human and rat fetal testes. *PloS One*. 10(2), e0117226.
- BERGER R., FOSTER W. a DECATANZARO D., 2010. Bisphenol-A exposure during the period of blastocyst implantation alters uterine morphology and perturbs measures of estrogen and progesterone receptor expression in mice. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*. 30, 393–400.
- BERNI, M., GIGANTE P., BUSSOLATI S., GRASSELLI F., GROLLI S., RAMONI R. a BASINI G., 2019. Bisphenol S, a Bisphenol A alternative, impairs swine ovarian and adipose cell functions. *Domestic Animal Endocrinology*. 66, 48–56.
- BING YZ., NAGA T., RODRIGUEZ-MARTINEZ H., Effects of cysteamine, FSH and estradiol-17beta on in vitro maturation of porcine oocytes. *Theriogenology*. 2001;55(4):867-876.
- BLACK J. L. a ERICKSON B. H., 1968. Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *The Anatomical Record*. 161(1), 45–55.

BLERKOM J., DAVIS P. W. a LEE J., 1995. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. 1995, 10.

BODENSTEINER K.J., WILTBANK M.C., BERGFELT D.R. a GINTHER O.J., 1996. Alterations in follicular estradiol and gonadotropin receptors during development of bovine antral follicles. *Theriogenology*. 45(2), 499–512.

BRAMA M., GNESSI L., BASCIANI S., CERULLI N., POLITI L., SPERA G., MARIANI S., CHERUBINI S., SCOTTO D'ABUSCAO A., SCANDURRA R. a MIGLIACCIO S., 2007. Cadmium induces mitogenic signaling in breast cancer cell by an ERalpha-dependent mechanism. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 264(1–2), 102–108.

BREVINI T. A. L., VASSENA R., FRANCISCI CH. a GANDOLFI F., 2005. Role of Adenosine Triphosphate, Active Mitochondria, and Microtubules in the Acquisition of Developmental Competence of Parthenogenetically Activated Pig Oocytes. *Biology of Reproduction* 72(5), 1218–1223.

BRUNET S. a MARO B., 2005. Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space. *Reproduction* 130(6), 801–811.

BUKOVSKY A., CAUDLE M. R., SVETLIKOVA M. a UPADHYAYA N. B., 2004. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2, 20.

CALARCO P. G., 1995. Polarization of mitochondria in the unfertilized mouse oocyte. *Developmental Genetics*. 16(1), 36–43.

CAMPEN K. A., KUCHARCZYK K. M., BOGIN B., EHRLICH J. M a COMBELLES C. M. H., 2018. Spindle abnormalities and chromosome misalignment in bovine oocytes after exposure to low doses of bisphenol A or bisphenol S. *Human Reproduction*. 33(5), 895–904.

CAN A., SEMIZ O. a CINAR O., 2005. Bisphenol-A induces cell cycle delay and alters centrosome and spindle microtubular organization in oocytes during meiosis. *MHR: Basic science of reproductive medicine*. 11(6), 389–396. I

CASAS M., VALVI D., LUQUE N., BALLESTEROS-GOMEZ A., CARSIN A., FERNANDEZ M. F., KOCH H. M., MENDEZ M. A., SUNYER J., RUBIO S. a VRIJHEID M., 2013. Dietary and sociodemographic determinants of bisphenol A urine concentrations in pregnant women and children. *Environment International*. 56, 10–18.

CIPOLAT S., BRITO O. M., ZILIO B. a SCORRANO L., 2004. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101(45), 15927–15932.

COBELLIS L., COLACURCI N., TRABUCCO E., CARPENTIERO C. a GRUMETTO L., 2009. Measurement of bisphenol A and bisphenol B levels in human blood sera from healthy and endometriotic women. *Biomedical Chromatography*. 23(11), 1186–1190.

- COHEN, J., ALIKANI M., TROWBRIDGE J. a ROSENWAKS Z., 1992. Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. *Human Reproduction (Oxford, England)* 7(5), 685–691.
- COSKUN S., UZUMCU M., LIN Y. C., FRIEDMAN CH. a ALAK B. M., 1995. Regulation of Cumulus Cell Steroidogenesis by the Porcine Oocyte and Preliminary Characterization of Oocyte-Produced Factor(s). *Biology of Reproduction*. 53(3), 670–675.
- COTICCHIO G., GUGLIELMO M. C., DAL CANTO M., FADINI R., MIGNINI RENZINI M., DE PONTI E., BRAMBILLASCA F. a ALBERTINI D. F., 2013. Mechanistic foundations of the metaphase II spindle of human oocytes matured in vivo and in vitro. *Human Reproduction (Oxford, England)*. 28(12), 3271–3282.
- CREWS C. M. a ERIKSON R. L., 1992. Purification of a murine protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product: relationship to the fission yeast *byr1* gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89(17), 8205–8209.
- CUI Z., YU L., SHI YANG X., ZHANG Y., SHI X., LI Y., CHEN Q. a XIONG B., 2019. Brefeldin A impairs porcine oocyte meiotic maturation via interruption of organelle dynamics. *Journal of Cellular Physiology*. 234(11), 20111–20117.
- DANZL E., SEI K., SODA S., IKE M. a FUJITA M., 2009. Biodegradation of Bisphenol A, Bisphenol F and Bisphenol S in Seawater. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 6(4), 1472–1484.
- DE BRITO O. M. a SCORRANO L., 2008. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*. 456(7222), 605–610.
- DE FELICI M., DOLCI S. a SIRACUSA G., 1991. An increase of intracellular free Ca^{2+} is essential for spontaneous meiotic resumption by mouse oocytes. *Journal of Experimental Zoology* . 260(3), 401–405.
- DIAMANTI-KANDARAKIS E., BOURGUIGNON J., GIUDICE L. C., HAUSER R., PRINS G. S., Ana M. SOTO, R. Thomas ZOELLER a Andrea C. GORE, 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews* . 30(4), 293–342.
- DONG J., ALBERTINI D. F., NISHIMORI K., KUMAR T. R., LU N. a MATZUK M. M., 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*. 383(6600), 531–535.
- DOWNS S. M., DANIEL S. A. a EPPIG J. J., 1988. Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes by follicle-stimulating hormone and epidermal growth factor: evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. *The Journal of Experimental Zoology*. 245(1), 86–96.

ECAY T. W. a POWERS R. D., 1990. Differential effects of testosterone and dibutyryl cyclic AMP on the meiotic maturation of mouse oocytes in vitro. *Journal of Experimental Zoology* . 253(1), 88–98.

EFSA, 2015. Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal*. 1040.

EHRlich S., WILLIAMS P. L., MISSMER S. A., FLAWS J. A., BERRY K. F., CALAFAT A. M., YE X., PETROZZA J. C., WRIGHT D. a HAUSER R., 2012a. Urinary Bisphenol A Concentrations and Implantation Failure among Women Undergoing *in Vitro* Fertilization. *Environmental Health Perspectives*. 120(7), 978–983.

EHRlich S., WILLIAMS P. L., MISSMER S. A., FLAWS J. A., BERRY K. F., CALAFAT A. M., YE X., PETROZZA J. C., WRIGHT D. a HAUSER R. 2012b. Urinary bisphenol A concentrations and early reproductive health outcomes among women undergoing IVF. *Human Reproduction (Oxford, England)*. 27(12), 3583–3592.

EICHENLAUB-RITTER U. a PESCHKE M., 2002. Expression in in-vivo and in-vitro growing and maturing oocytes: focus on regulation of expression at the translational level. *Human Reproduction Update*. 8(1), 21–41.

EICHENLAUB-RITTER U., 2012. Oocyte ageing and its cellular basis. *The International Journal of Developmental Biology*. 56(10–12), 841–852.

EICHENLAUB-RITTER U., VOGT E., CUKURCAM S., SUN F., PACCHIEROTTI F. a PARRY J., 2008. Exposure of mouse oocytes to bisphenol A causes meiotic arrest but not aneuploidy. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 651(1–2), 82–92. I

EL-JOUNI W., JANG B., HAUN S. a MACHACA K., 2005. Calcium signaling differentiation during *Xenopus* oocyte maturation. *Developmental Biology*. 288(2), 514–525.

EPPIG J. J., 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122(6), 829–838.

EPPIG J. J., 2018. Reproduction: Oocytes Call, Granulosa Cells Connect. *Current biology: CB*. 28(8), R354–R356.

FAIR T., HYTTEL P. a GREVE T., 1995. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Molecular Reproduction and Development*. 42(4), 437–442.

FARINI D., LA SALA G., TEDESCO M. a DE FELICI M., 2007. Chemoattractant action and molecular signaling pathways of Kit ligand on mouse primordial germ cells. *Developmental Biology*. 306(2), 572–583.

FERREIRA E. M., VIREQUE A. A., ADONA P. R., MEIRELLES F. V., FERRIANI R. A. a NAVARRO P.A.A.S., 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and

biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. 71(5), 836–848.

FISSORE R. A., HE C. L. a VANDE WOUDE G. F., 1996. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biology of Reproduction*. 55(6), 1261–1270.

GANESAN S. a KEATING A. F., 2016. Bisphenol A-Induced Ovotoxicity Involves DNA Damage Induction to Which the Ovary Mounts a Protective Response Indicated by Increased Expression of Proteins Involved in DNA Repair and Xenobiotic Biotransformation. *Toxicological Sciences*. 152(1), 169–180.

GARDNER A. J. a EVANS J. P., 2005. Mammalian membrane block to polyspermy: new insights into how mammalian eggs prevent fertilisation by multiple sperm. *Reproduction, Fertility and Development*. 18(2), 53–61.

GILL A., JAMNONGJIT M. a HAMMES S. R., 2004. Androgens Promote Maturation and Signaling in Mouse Oocytes Independent of Transcription: A Release of Inhibition Model for Mammalian Oocyte Meiosis. *Molecular Endocrinology*. 18(1), 97–104.

GINTHER O.J., BEG M.A., DONADEU F.X. a BERGFELT D.R., 2003. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Animal Reproduction Science*. 78(3–4), 239–257.

GOASCOGNE C. L., SANANÈS N., GOUÉZOU M. a BAULIEU E., 1985. Testosterone-induced meiotic maturation of *Xenopus laevis* oocytes: Evidence for an early effect in the synergistic action of insulin. *Developmental Biology*. 109(1), 9–14.

GOSDEN R., KRAPEZ J. a BRIGGS D., 1997. Growth and development of the mammalian oocyte. *BioEssays*. 19(10), 875–882.

GROSS S. D., SCHWAB M. S., LEWELLYN A. L. a MALLER J. L., 1999. Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by the protein kinase p90Rsk. *Science (New York, N.Y.)*. 286(5443), 1365–1367.

GROTH C. G., 2007. Prospects of using organs and cells from pigs for transplantation into humans. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban = Journal of Central South University. Medical Sciences*. 32(1), 20–25.

GÜNESDOĞAN U. a SURANI M. A., 2016. Developmental Competence for Primordial Germ Cell Fate. *Current Topics in Developmental Biology*. 117, 471–496.

HÉLIÈS-TOUSSAINT C., PEYRE L., COSTANZO C., CHAGNON M. a RAHMANI R., 2014. Is bisphenol S a safe substitute for bisphenol A in terms of metabolic function? An in vitro study. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 280(2), 224–235.

HILL C. E., SAPOUCKEY S. A., SUVOROV A. a VANDENBERG L., 2017. Developmental exposures to bisphenol S, a BPA replacement, alter estrogen-responsiveness of the female reproductive tract: a pilot study. *Cogent medicine*. 4(1) [vid. 2019-11-01].

HO S., TANG W., BELMONTE DE FRAUSTO J a PRINS G. S, 2006. Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Research*. 66(11), 5624–5632.

HOLT J. E., LANE S. I. R a JONES K., 2013. The Control of Meiotic Maturation in Mammalian Oocytes. *Current Topics in Developmental Biology*. 102, 207–226.

HOLT J. E., TRAN S. M.-T, STEWART J. L., MINAHAN K., GARCÍA-HIGUERA I., MORENO S. a JONES K., 2011. The APC/C activator FZR1 coordinates the timing of meiotic resumption during prophase I arrest in mammalian oocytes. *Development (Cambridge, England)*. 138(5), 905–913.

HOLUBCOVA Z., BLAYNEY M., ELDER K. a SCHUH M., 2015. Error-prone chromosome-mediated spindle assembly favors chromosome segregation defects in human oocytes. *Science (New York, N.Y.)*. 348(6239), 1143–1147.

HORNER K., LIVERA G., HINCKLEY M., TRINH K., STORM D. a CONTI M., 2003. Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest. *Developmental Biology*. 258(2), 385–396.

HUNTER M. G., 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of reproduction*. 5 122–30.

HUTT K.J., MCLAUGHLIN E.A. a HOLLAND M.K, 2006. Kit ligand and c-Kit have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. *MHR: Basic science of reproductive medicine*. 12(2), 61–69.

HYTTEL P., FAIR T., AVERY A., CALLESEN H. a GREVE T., 2008. Transcriptional Activity and Ultrastructure in Bovine Oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*. 34, 447–454.

CHEN M.-Y., IKE M. a FUJITA M., 2002. Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol-A and other bisphenols. *Environmental Toxicology*. 17(1), 80–86. ISSN 1520-4081.

CHIAN R., AO A., CLARKE H., TULANDI T. a TAN S., 1999a. Production of steroids from human cumulus cells treated with different concentrations of gonadotropins during culture in vitro. *Fertility and Sterility* 71(1), 61–66.

CHIAN R.-CH., AO A., CLARKE H., TULANDI T. a TAN S., 1999b. Production of steroids from human cumulus cells treated with different concentrations of gonadotropins during culture in vitro. *Fertility and Sterility* 71(1), 61–66.

CHUVA DE SOUSA LOPES S. M., VAN DEN DRIESCHE S., CARVALHO R., LARSSON J., EGGEN B., SURANI M. a MUMMERY CH. L., 2005. Altered primordial germ cell migration in the absence of transforming growth factor beta signaling via ALK5. *Developmental Biology*. 284(1), 194–203.

- IKAMI K., NUZHAT N. a LEI L., 2017. Organelle transport during mouse oocyte differentiation in germline cysts. *Current Opinion in Cell Biology*. 44, Cell Architecture, 14–19.
- IKEZUKI Y., TSUTSUMI O., TAKAI Y., KAMEI Y. a TAKETANI Y., 2002. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Human Reproduction*. 17(11), 2839–2841.
- INOUE M., NAITO K., AOKI F., TOYODA Y. a SATO E., 1995. Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocytes. *Zygote (Cambridge, England)*. 3(3), 265–271.
- IVRY DEL MORAL L., LE CORRE L., POIRIER H., NIOT I., TRUNTZER T., MERLIN J.-F., ROUIMI P., BESNARD P., RAHMANI R. a CHAGNON M. C., 2016. Obesogen effects after perinatal exposure of 4,4'-sulfonyldiphenol (Bisphenol S) in C57BL/6 mice. *Toxicology*. 357–358, 11–20.
- IWATA H., GOTO H., TANAKA H., SAKAGUCHI Y., KIMURA K., KUWAYAMA T. a MONJI Y., 2011. Effect of maternal age on mitochondrial DNA copy number, ATP content and IVF outcome of bovine oocytes. *Reproduction, Fertility, and Development* . 23(3), 424–432.
- JI K., HONG S., KHO Y. a CHOI K. 2013. Effects of Bisphenol S Exposure on Endocrine Functions and Reproduction of Zebrafish. *Environmental Science & Technology*. 47(15), 8793–8800.
- JIA Z., WANG H., FENG Z., ZHANG S., WANG L., ZHANG J., LIU Q., ZHAO, X. FENG D. a FENG X., 2019. Fluorene-9-bisphenol exposure induces cytotoxicity in mouse oocytes and causes ovarian damage. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 180, 168–178.
- JIN H. a ZHU L., 2016. Occurrence and partitioning of bisphenol analogues in water and sediment from Liaohe River Basin and Taihu Lake, China. *Water Research*. 103, 343–351.
- JOHNSON J., CANNING J., KANEKO, T., PRU J. K a TILLY J., 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 428(6979), 145–150.
- JONES K T., 2011. Anaphase-promoting complex control in female mouse meiosis. *Results and Problems in Cell Differentiation*. 53, 343–363.
- KANITZ W., 2001. Comparative Aspects of Follicular Dynamic, Follicular and Oocyte Maturation and Ovulation in cattle and pigs. 16, 9-23.
- KAUFMAN M. L. a HOMA S. T., 1993. Defining a role for calcium in the resumption and progression of meiosis in the pig oocyte. *Journal of Experimental Zoology*. 265(1), 69–76.
- KEZELE P., NILSSON E. a SKINNER M. K., 2002. Cell-cell interactions in primordial follicle assembly and development. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 7. d1990-6.

KIKUCHI K., NAITO K., NOGUCHI J., SHIMADA A., KANEKO A., YAMASHITA M., AOKI F., TOJO H. a TOYODA Y., 2000. Maturation/M-phase promoting factor: a regulator of aging in porcine oocytes. *Biology of Reproduction*. 63(3), 715–722.

KIM N. H., CHUNG H. M., CHA K. Y. a CHUNG K. S., 1998. Microtubule and microfilament organization in maturing human oocytes. *Human Reproduction*. 13(8), 2217–2222.

KIM S., GWON D., KIM J. A., CHOI H. a JANG CH., 2019. Bisphenol A disrupts mitotic progression via disturbing spindle attachment to kinetochore and centriole duplication in cancer cell lines. *Toxicology in Vitro*. 59, 115–125. ISSN 08872333.

KISHIMOTO T., 2003. Cell-cycle control during meiotic maturation. *Current Opinion in Cell Biology*. 15(6), 654–663.

KONGMANA K., KRUEVAISAYAWAN H., SAEWU A., SUGENG C., FERNANDES J., SOUDA P., et. al. 2015. Proteomic Characterization of Pig Sperm Anterior Head Plasma Membrane Reveals Roles of Acrosomal Proteins in ZP3 Binding. *Journal of Cellular Physiology*. 230(2), 449–463.

KOTANI T., YASUDA K., OTA R. a YAMASHITA M., 2013. Cyclin B1 mRNA translation is temporally controlled through formation and disassembly of RNA granules. *The Journal of Cell Biology*. 202(7), 1041–1055.

LAZAR S., GALIANI D. a DEKEL N., 2002. cAMP-Dependent PKA Negatively Regulates Polyadenylation of c-mos mRNA in Rat Oocytes. *Molecular Endocrinology* [online]. 16(2), 331–341. ISSN 0888-8809. Dostupné z: doi:10.1210/mend.16.2.0767

LEE J., MIYANO T. a MOOR R. M., 2000. Spindle Formation and Dynamics of γ -Tubulin and Nuclear Mitotic Apparatus Protein Distribution During Meiosis in Pig and Mouse Oocytes. *Biology of Reproduction* 62(5), 1184–1192.

LEHMANN L. a METZLER M., 2004. Bisphenol A and its methylated congeners inhibit growth and interfere with microtubules in human fibroblasts in vitro. *Chemico-Biological Interactions*. 147(3), 273–285.

LI, Guang-Peng, Ying LIU, Thomas D. BUNCH, Kenneth L. WHITE a Kenneth I. ASTON, 2005. Asymmetric division of spindle microtubules and microfilaments during bovine meiosis from metaphase I to metaphase III. *Molecular Reproduction and Development*. 71(2), 220–226.

LI M., AI J. S., XU B. Z., XIONG B., YIN S., LIN S., HOU Y., CHEN D. Y., SCHATTEN H. a SUN Q., 2008. Testosterone Potentially Triggers Meiotic Resumption by Activation of Intra-Oocyte SRC and MAPK in Porcine Oocytes1. *Biology of Reproduction*. 79(5), 897–905.

LIAO CH., LIU F., ALOMIRAH H., LOI V. D., MOHD M. A., MOON H., NAKATA H. a KANNAN K., 2012a. Bisphenol S in Urine from the United States and Seven Asian Countries: Occurrence and Human Exposures. *Environmental Science & Technology*. 46(12), 6860–6866.

LIA CH., LIU F., GUO Y., MOON H., NAKATA H., WU Q. a KANNAN K., 2012b. Occurrence of eight bisphenol analogues in indoor dust from the United States and several Asian countries: implications for human exposure. *Environmental Science & Technology*. 46(16), 9138–9145.

LINCOLN A. J., WICKRAMASINGHE D., STEIN P., SCHULTZ R. M., PALKO M. E, DE MIGUEL, TESSAROLLO M. a DONOVAN P. J., 2002. Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nature Genetics*. 30(4), 446–449.

LIU W., XIN Q., WANG X., WANG S., WANG H., ZHANG W., YANG Y., ZHANG Y., ZHANG Z., WANG CH., XU Y., DUAN E. a XIA G., 2017. Estrogen receptors in granulosa cells govern meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes in mammals. *Cell Death & Disease*. 8(3), e2662–e2662.

LONERGAN P., MONAGHAN P., RIZOS D., BOLAND M. P. a GORDON I., 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Molecular Reproduction and Development*. 37(1), 48–53.

LUCAS X., MARTÍNEZ E.A, ROCA J., VÁZQUEZ J.M, GIL M.A., PASTOR L.M. a ALABART J.L., 2002. Relationship between antral follicle size, oocyte diameters and nuclear maturation of immature oocytes in pigs. *Theriogenology*. 58(5), 871–885.

LUTZ L. B., COLE L. M., GUPTA M. K., KWIST K. W., AUCHUS R. J. a HAMMES S. R., 2001. Evidence that androgens are the primary steroids produced by *Xenopus laevis* ovaries and may signal through the classical androgen receptor to promote oocyte maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98(24), 13728–13733. I

MA W. a VIVEIROS M. M., 2014. Depletion of pericentrin in mouse oocytes disrupts microtubule organizing center function and meiotic spindle organization: PERICENTRIN FUNCTION IN MOUSE OOCYTES. *Molecular Reproduction and Development*. 81(11), 1019–1029.

MACHTINGER R., COMBELLES C. M. H., Stacey A. MISSMER, Katharine F. CORREIA, Paige WILLIAMS, Russ HAUSER a Catherine RACOWSKY, 2013. Bisphenol-A and human oocyte maturation in vitro. *Human Reproduction (Oxford, England)*. 28(10), 2735–2745.

MALLER J. I., GAUTIER J., LANGAN T. A., LOHKA M. J., SHENOY S., SHALLOWAY D. a NURSE P., 1989. Maturation-promoting factor and the regulation of the cell cycle. *Journal of Cell Science. Supplement*. 12, 53–63.

MARCHAL R., VIGNERON C., PERREAU C., BALI-PAPP A. a MERMILLOD P., 2002. Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology*. 57(5), 1523–1532.

MASCIARELLI S., HORNER K., LIU CH., PARK S., HINCKLEY M., HOCKMAN S., NEDACHI T., JIN C., CONTI M. a MANGANIELLO V., 2004. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. *The Journal of Clinical Investigation*. 114(2), 196–205.

- MASUI Y., 1991. The Role of „Cytostatic Factor (CSF)" in the Control of Oocyte Cell Cycles: A Summary of 20 Years of Study. (CSF/MPF/Cell Cycle/Metaphase Arrest). *Development, Growth and Differentiation*. 33(6), 543–551.
- MATHEW M., SREEDHANYA S., MANOJ P., ARAVINDAKUMAR C. T. a ARAVIND U. K., 2014. Exploring the Interaction of Bisphenol-S with Serum Albumins: A Better or Worse Alternative for Bisphenol A? *The Journal of Physical Chemistry B*. 118(14), 3832–3843.
- MEHLMANN L. M., TERASAKI M., JAFFE L. A. a KLINE D., 1995. Reorganization of the endoplasmic reticulum during meiotic maturation of the mouse oocyte. *Developmental Biology*. 170(2), 607–615.
- MEHLMANN L. M., SAEKI Y., TANAKA S., BRENNAN T. J., EVSIKOV A. L., PENDOLA F. L., KNOWLES B. B., EPPIG J. J a JAFFE L. A., 2004. The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. *Science (New York, N.Y.)*. 306(5703), 1947–1950.
- MELNICK R., LUCIER G., WOLFE M., HALL R., STANCEL G., PRINS G., GALLO M., REUHL K., HO S., BROWN T., MOORE J., LEAKEY J., HASEMAN J. a KOHN M., 2002. Summary of the National Toxicology Program's report of the endocrine disruptors low-dose peer review. *Environmental Health Perspectives*. 110(4), 427–431.
- MENDONCA K., HAUSER R., CALAFAT A. M., ARBUCKLE T. E. a DUTY S. M., 2014. Bisphenol A concentrations in maternal breast milk and infant urine. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 87(1), 13–20. ISSN 1432-1246.
- MENG Z., WANG D., LIU W., LI R., YAN S., JIA M., ZHANG L., ZHOU Z. a ZHU W., 2019. Perinatal exposure to Bisphenol S (BPS) promotes obesity development by interfering with lipid and glucose metabolism in male mouse offspring. *Environmental Research*. 173, 189–198.
- MENG Z., WANG Z., YAN S., LI R., YAN J., TENG M., HOU Z. a ZHU W., 2018. Effects of perinatal exposure to BPA and its alternatives (BPS, BPF and BPAF) on hepatic lipid and glucose homeostasis in female mice adolescent offspring. *Chemosphere*. 212, 297–306.
- MERDES A., RAMYAR K., VECHIO K. a CLEVELAND D. W., 1996. A complex of NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly. *Cell*. 87(3), 447–458.
- MILEVA G., BAKER S. L., KONKLE A. T. M. a BIELAJEW C., 2014. Bisphenol-A: Epigenetic Reprogramming and Effects on Reproduction and Behavior. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 11(7), 7537–7561.
- MOK-LIN E., EHRLICH S., WILLIAMS P. L., PETROZZA J., WRIGHT D. L., CALAFAT A. M., YE X. a HAUSER R., 2010. Urinary bisphenol A concentrations and ovarian response among women undergoing IVF. *International Journal of Andrology*. 33(2), 385–393.
- MORLEY P., WHITFIELD J. F., VANDERHYDEN B. C., TSANG B. K. a SCHWARTZ J. L., 1992. A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. 8.

MOSSELMAN S., POLMAN J. a DIJKEMA R., 1996. ER13" identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters*. 5.

MOTLIK J., CROZET N. a FULKA J., 1984a. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Reproduction*. 72(2), 323–328.

MOTLÍK J. a FULKA J., 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*. 25(1), Twelfth Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, 87–96.

MOTLÍK J. a FULKA J., 1976. Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Zoology*. 198(2), 155–162.

MURAKOSHI Y., SUEOKA K., TAKAHASHI K., SATO S., SAKURAI T., TAJIMA H. a YOSHIMURA Y., 2013. Embryo developmental capability and pregnancy outcome are related to the mitochondrial DNA copy number and ooplasmic volume. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 30(10), 1367–1375.

MURRAY A. W. a KIRSCHNER M., 1989. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature*. 339(6222), 275–280.

NADERI M., WONG M.Y.L. a GHOLAMI F., 2014. Developmental exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. *Aquatic Toxicology*. 148, 195–203.

NAGANO M., KATAGIRI S. a TAKAHASHI Y., 2006. ATP content and maturational/developmental ability of bovine oocytes with various cytoplasmic morphologies. *Zygote (Cambridge, England)*. 14(4), 299–304.

NAWAZ Z., TSAI M. J. a MCDONNELL D. P., 1992. Identification of novel steroid-response elements. *Gene expression*. 39–47.

NEVORAL J., KOLINKO J., MORAVEC J., ŽALMANOVÁ T., HOŠKOVÁ K., PROKEŠOVÁ Š., KLEIN P., GHAIBOUR K., HOŠEK P., ŠTIAVNICKÁ M., ŘIMNÁČOVÁ H., TONAR Z., PETR J. a KRÁLÍČKOVÁ M., 2018. Long-term exposure to very low doses of bisphenol S affects female reproduction. *Reproduction*. 156(1), 47–57.

NIU Y., WANG B., ZHAO Y., ZHANG J. a SHAO S., 2017. Highly Sensitive and High-Throughput Method for the Analysis of Bisphenol Analogues and Their Halogenated Derivatives in Breast Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65(48), 10452–10463.

NORRIS R. P., FREUDZON L., FREUDZON M., HAND A. R., MEHLMANN L. M. a LJAFJE L., 2007. A G(s)-linked receptor maintains meiotic arrest in mouse oocytes, but luteinizing hormone does not cause meiotic resumption by terminating receptor-G(s) signaling. *Developmental Biology*. 310(2), 240–249.

NORRIS R. P., RATZAN W. J., FREUDZON M., MEHLMANN L., KRALL J., MOVSESIAN M. A., WANG H., KE H., NIKOLAEV V.O a JAFJE L. A., 2009. Cyclic GMP from the surrounding

somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development (Cambridge, England)*. 136(11), 1869–1878.

NOURIAN A., SOLEIMANZADEH A., JALALI A. S. a NAJAFI G., 2017. Effects of bisphenol-S low concentrations on oxidative stress status and in vitro fertilization potential in mature female mice. *Veterinary reaserch forum*. 8, 341-345

OH J. S., HAN S. J a CONTI M., 2010. Wee1B, Myt1, and Cdc25 function in distinct compartments of the mouse oocyte to control meiotic resumption. *The Journal of Cell Biology*. 188(2), 199–207.

PALMER A., GAVIN A. C. a NEBRED A. R., 1998. A link between MAP kinase and p34(cdc2) /cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *The EMBO journal*. 17(17), 5037–5047.

PAULES R. S., BUCCIONE R., MOSCHEL R. C., VANDE WOUDE G. F. a EPPIG J. J., 1989. Mouse Mos protooncogene product is present and functions during oogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86(14), 5395–5399.

PAVLOK A., LUCAS-HAHN A. a NIEMANN H., 1992. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Molecular Reproduction and Development*. 31(1), 63–67.

PAWLAK, P., CIESLAK A., WARZYCH E., ZEJDEN Z., SZUMACHER-STRABEL M., MOLINSKA-GLURA M. a LECHNIAK D., 2012. No single way to explain cytoplasmic maturation of oocytes from prepubertal and cyclic gilts. *Theriogenology*. 78(9), 2020–2030.

PEPLING M. E. a SPRADLING A. C., 2001. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Developmental Biology*. 234(2), 339–351.

PEPLING M. E., 2006. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *genesis*. 44(12), 622–632.

PETERS J. M., 2006. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 7(9), 644–656. I

PETR, J., URBÁNKOVÁ D., TOMÁNEK M., ROZINEK J. a JÍLEK F., 2002. Activation of in vitro matured pig oocytes using activators of inositol triphosphate or ryanodine receptors. *Animal Reproduction Science*. 70(3), 235–249.

PICTON H., BRIGGS D. a GOSDEN R., 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 145(1–2), 27–37.

PIHAN G. A., PUROHIT A., WALLACE J., MALHOTRA R., LIOTTA L. a DOXSEY S. J., 2001. Centrosome Defects Can Account for Cellular and Genetic Changes That Characterize Prostate Cancer Progression. *Cancer Research*. 61(5), 2212–2219.

POLAN M. L., LAUFER N., OHKAWA R., BOTERO-RUIZ W., HASELTINE F. P., DECHERNEY A. H. a BEHRMAN H. R., 1984. The Association between Granulosa Cell Aromatase Activity and Oocyte-Corona-Cumulus-Complex Maturity from Individual Human Follicles. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 59(1), 170–174.

POZZAN T., RIZZUTO R., VOLPE P. a MELDOLESI J., 1994. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiological Reviews*. 74(3), 595–636.

PROKEŠOVÁ Š., GHAIBOUR K., LIŠKA F., KLEIN P., FENCLOVÁ T., ŠTIAVNICKÁ M., HOŠEK P., ŽALMANOVÁ T., HOŠKOVÁ K., ŘIMNÁČOVÁ H., PETR J., KRÁLÍČKOVÁ M. a NEVORAL J., 2020. Acute low-dose bisphenol S exposure affects mouse oocyte quality. *Reproductive Toxicology*. 93, 19–27.

RACOWSKY C., 1985. Effect of forskolin on maintenance of meiotic arrest and stimulation of cumulus expansion, progesterone and cyclic AMP production by pig oocyte-cumulus complexes. *Journal of Reproduction and Fertility*. 74(1), 9–21.

READER K., STANTON J. a JUENGEL J., 2017. The Role of Oocyte Organelles in Determining Developmental Competence. *Biology*. 6(4), 35.

REIMANN J. D., FREED E., HSU J. Y., KRAMER E. R., PETERS J. M. a JACKSON P. K., 2001. Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex. *Cell*. 105(5), 645–655.

REIMANN J. D. R. a JACKSON P. K., 2002. Emi1 is required for cytostatic factor arrest in vertebrate eggs. *Nature*. 416(6883), 850–854.

RICHARDS J. S., RUSSELL D. L., OCHSNER S. a ESPEY L. L., 2002. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annual Review of Physiology*. 64, 69–92.

RICHTER J.D. a MCGAUGHEY R. W., 1979. Specificity of inhibition by steroids of porcine oocyte maturation in vitro. *Journal of Experimental Zoology*. 209(1), 81–90.

ROBINSON J. W., ZHANG M., SHUHAIBAR L. C., NORRIS R. P., GEERTS A., WUNDER F., EPPIG J. J., POTTER L. R. a JAFFE L. A., 2012. Luteinizing hormone reduces the activity of the NPR2 guanylyl cyclase in mouse ovarian follicles, contributing to the cyclic GMP decrease that promotes resumption of meiosis in oocytes. *Developmental Biology*. 366(2), 308–316.

ROSENFELD C. S., WAGNER J. S., ROBERTS R. M. a LUBAHN D. B., 2001. Intraovarian actions of oestrogen. *Reproduction*. 122(2), 215–226.

ROSENMAI A. K., DYBDAHL M., PEDERSEN M., ALICE VAN VUGT-LUSSENBURG B. M., WEDEBYE E. B., TAXVIG C. a VINGGAARD A. M., 2014. Are Structural Analogues to Bisphenol A Safe Alternatives? *Toxicological Sciences*. 139(1), 35–47.

ROSNER M. H., SANTO R. J., ARNHEITER H. a STAUDT L. M., 1991. Oct-3 is a maternal factor required for the first mouse embryonic division. *Cell*. 64(6), 1103–1110.

SAAL F. S. v., TIMMS B. G., MONTANO M. M., PALANZA P., THAYER K. A., NAGEL S. C., DHAR M. D., GANJAM V. K., PARMIGIANI S. a WELSHONS W. V., 1997. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94(5), 2056–2061.

SAGATA N., WATANABE N., VANDE WOUDE G. F. a IKAWA Y., 1989. The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature*. 342(6249), 512–518.

SANTEL A. a FULLER M. T., 2001. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *Journal of Cell Science*. 114(Pt 5), 867–874.

SASTRE-SERRA J., NADAL-SERRANO M., PONS D. G., ROCA P. a OLIVER J., 2012. Mitochondrial dynamics is affected by 17 β -estradiol in the MCF-7 breast cancer cell line. Effects on fusion and fission related genes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 44(11), 1901–1905.

SATHANANTHAN A. H., SELVARAJ K., GIRIJASHANKAR M. L., GANESH V., SELVARAJ P. a TROUNSON A. O, 2006. From oogonia to mature oocytes: Inactivation of the maternal centrosome in humans. *Microscopy Research and Technique*. 69(6), 396–407.

SEN A. a HAMMES S. R., 2010. Granulosa Cell-Specific Androgen Receptors Are Critical Regulators of Ovarian Development and Function. *Molecular Endocrinology*. 24(7), 1393–1403.

SHERWOOD S. W., KUNG A. L., ROITELMAN J., SIMONI R. D a SCHIMKE R. T., 1993. In vivo inhibition of cyclin B degradation and induction of cell-cycle arrest in mammalian cells by the neutral cysteine protease inhibitor N-acetyl-leucylleucyl-norleucinal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90(8), 3353–3357.

SHI M., SEKULOVSKI N., MACLEAN J. A. a HAYASHI K., 2017. Effects of bisphenol A analogues on reproductive functions in mice. *Reproductive Toxicology*. 73, 280–291.

SHIMADA M., 2002. FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in cumulus cells: a requirement for meiotic resumption in porcine oocytes. *Molecular Human Reproduction*. 8(7), 612–618.

SHIMADA M. a TERADA T., 2002. Roles of cAMP in regulation of both MAP kinase and p34cdc2 kinase activity during meiotic progression, especially beyond the MI stage. *Molecular reproduction and development*. 62, 124–31.

SCHMUTZLER C., HAMANN I., HOFMANN P. J., KOVACS G., STEMMER L., MENTRUP B., SCHOMBURG L., AMBRUGGER L., GRÜTERS A., SEIDLOVA-WUTTKE D., ARRY H., WUTTKE W. a KÖHRLE J., 2004. Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. *Toxicology*. 205(1–2), 95–102.

SCHNEEBERGER M., DIETRICH M. O., SEBASTIÁN D., IMBERNÓN M., CASTAÑO C., GARCIA A., ESTEBAN Y., GONZALEZ-FRANQUESA A., RODRÍGUEZ I. C., BORTOLOZZI A., GARCIA-ROVES P. M., GOMIS R., NOGUEIRAS R., HORVATH T., ZORZANO A. a CLARET M., 2013. Mitofusin 2 in POMC neurons connects ER stress with leptin resistance and energy imbalance. *Cell*. 155(1), 172–187.

SCHUG T. T., JANESICK A., BLUMBERG B. a HEINDEL J. J., 2011. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 127(3–5), 204–215.

SCHUH M. a ELLENBERG J., 2007. Self-organization of MTOCs replaces centrosome function during acentrosomal spindle assembly in live mouse oocytes. *Cell*. 130(3), 484–498.

SCHULTZ R. M., MONTGOMERY R. R. a BELANOFF J. R., 1983. Regulation of mouse oocyte meiotic maturation: implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. *Developmental Biology*. 97(2), 264–273.

SIRARD M. A., FLORMAN H. M., LEIBFRIED-RUTLEDGE M. L., BARNES F. L., SIMS M. L a FIRST N. L., 1989. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biology of Reproduction* . 40(6), 1257–1263.

SMARR M. M., KANNAN K., SUN L., HONDA L., WANG W., KARTHIKRAJ R., CHEN Z., WECK J. a BUCK LOUIS G., 2018. Preconception seminal plasma concentrations of endocrine disrupting chemicals in relation to semen quality parameters among male partners planning for pregnancy. *Environmental Research*. 167, 78–86.

SORENSEN R. A., CYERT M. S. a PEDERSEN M. S., 1985. Active maturation-promoting factor is present in mature mouse oocytes. *The Journal of Cell Biology* [online]. 100(5), 1637–1640.

SOYAL S. M., AMLEH A. a DEAN J., 2000. FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development (Cambridge, England)*. 127(21), 4645–4654.

STOJKOVIC M., MACHADO S. A., STOJKOVIC P., ZAKHARTCHENKO V., HUTZLER P., GONÇALVES P. B. a WOLF E., 2001. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biology of Reproduction*. 64(3), 904–909.

SUN Q. Y., BLUMENFELD Z., RUBINSTEIN S., GOLDMAN S., GONEN Y. a BREITBART H., 1999a. Mitogen-activated protein kinase in human eggs. *Zygote (Cambridge, England)*. 7(2), 181–185.

SUN Q. Y., BREITBART H. a SCHATTEN H., 1999b. Role of the MAPK cascade in mammalian germ cells. *Reproduction, Fertility, and Development* [online]. 11(7–8), 443–450. ISSN 1031-3613.

- SUN Q. Y., WU G. M., LAI L., PARK K. W., CABOT R., CHEONG H. T., DAY B. N., PRATHER R. S. a SCHATTEN H., 2001a. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction (Cambridge, England)*. 122(1), 155–163.
- SUN Q. Y., LAI L., PARK K. W., KÜHHOLZER B., PRATHER R. S. a SCHATTEN H., 2001b. Dynamic Events Are Differently Mediated by Microfilaments, Microtubules, and Mitogen-Activated Protein Kinase During Porcine Oocyte Maturation and Fertilization In Vitro. *Biology of Reproduction*. 64(3), 879–889.
- SUN Q. Y. a NAGAI T., 2003. Molecular Mechanisms Underlying Pig Oocyte Maturation and Fertilization. *Journal of Reproduction and Development*. 49(5), 347–359.
- SUSIARJO M., SASSON I., MESAROS C. a BARTOLOMEI M. S., 2013. Bisphenol A Exposure Disrupts Genomic Imprinting in the Mouse. *PLoS Genetics*. 9(4), e1003401.
- SZOLLOSI D., CALARCO P. a DONAHUE R. P., 1972. Absence of Centrioles in the First and Second Meiotic Spindles of Mouse Oocytes. *Journal of Cell Science*. 11(2), 521–541.
- TAKAI Y., TSUTSUMI O., IKEZUKI Y., KAMEI Y., OSUGA Y., YANO T. a TAKETAN Y., 2001. Preimplantation exposure to bisphenol A advances postnatal development. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*. 15(1), 71–74.
- TAN J. H. WANG H. L., SUN X. S., LIU Y., SUI H. a ZHANG J., 2009. Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. *Molecular Human Reproduction* [online]. 15(1), 1–9.
- TARAZONA, A. M., RODRÍGUEZ J. I., RESTREPO L. F. a OLIVERA-ANGEL M., 2006. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*. 41(1), 5–11.
- TESARIK J. a SOUSA M., 1996. Mechanism of calcium oscillations in human oocytes: a two-store model. *Molecular Human Reproduction*. 2(6), 383–386.
- THOMAS P. a DONG J., 2006. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: A potential novel mechanism of endocrine disruption. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 102(1–5), 175–179.
- TOKURA T., NODA Y., GOTO Y. a MORI T., 1993. Sequential observation of mitochondrial distribution in mouse oocytes and embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 10(6), 417–426.
- TORNER H., BRÜSSOW K.-P, ALM H., RATKY J., PÖHLAND V., TUCHSCHERER A. a KANITZ W., 2004. Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of pre-ovulatory maturation. *Theriogenology*. 61(9), 1675–1689.

TRAPPHOFF T., HEILIGENTAG M., EL HAJJ N., HAAF T. a EICHENLAUB-RITTER U., 2013a. Chronic exposure to a low concentration of bisphenol A during follicle culture affects the epigenetic status of germinal vesicles and metaphase II oocytes. *Fertility and Sterility*. 100(6), 1758-1767.e1.

TRAPPHOFF T., HEILIGENTAG M., EL HAJJ N., HAAF T. a EICHENLAUB-RITTER U., 2013b. Chronic exposure to a low concentration of bisphenol A during follicle culture affects the epigenetic status of germinal vesicles and metaphase II oocytes. *Fertility and Sterility*. 100(6), 1758-1767.e1.

TRASANDE L., ATTINA T. M. a BLUSTEIN J., 2012. Association between urinary bisphenol A concentration and obesity prevalence in children and adolescents. *JAMA*. 308(11), 1113–1121.

TRIMARCHI J. R., LIU L., PORTERFIELD D. M., SMITH P. J. a KEEFE D. L., 2000. Oxidative phosphorylation-dependent and – independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biology of Reproduction*. 62(6), 1866–1874.

TŮMOVÁ L., PETR J., ŽALMANOVÁ T., CHMELÍKOVÁ E., KOTT T., TICHOVSKÁ H., KUČEROVÁ-CHRPOVÁ V., HOŠKOVÁ K. a JÍLEK F., 2013. Calcineurin expression and localisation during porcine oocyte growth and meiotic maturation. *Animal Reproduction Science* 141(3), 154–163.

TUNG J. J., HANSEN D. V., BAN K. H., LOKTEV A. V., SUMMERS M. K., ADLER J. R. a JACKSON P. K., 2005. A role for the anaphase-promoting complex inhibitor Emi2/XErp1, a homolog of early mitotic inhibitor 1, in cytostatic factor arrest of Xenopus eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102(12), 4318–4323.

TUNQUIST B. J., EYERS P. A., CHEN L.G., LEWELLYN A. L. a MALLER J. L., 2003. Spindle checkpoint proteins Mad1 and Mad2 are required for cytostatic factor-mediated metaphase arrest. *The Journal of Cell Biology*. 163(6), 1231–1242.

TUNQUIST B. J. a MALLER J. M., 2003. Under arrest: cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes & Development*. 17(6), 683–710.

VACCARI S., WEEKS J. L., HSIEH M., MENNITI F. S. a CONTI M., 2009. Cyclic GMP Signaling Is Involved in the Luteinizing Hormone-Dependent Meiotic Maturation of Mouse Oocytes1. *Biology of Reproduction*. 81(3), 595–604.

VAN BLERKOM J., DAVIS P. W. a LEE J., 1995. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Human Reproduction (Oxford, England)*. 10(2), 415–424.

VAN BLERKOM, J. a RUNNER M. N., 1984. Mitochondrial reorganization during resumption of arrested meiosis in the mouse oocyte. *The American Journal of Anatomy* [online]. 171(3), 335–355.

2007. Mitochondrial signaling and fertilization. *Molecular Human Reproduction*. 13(11), 759–770.

- VAN BLERKOM J., DAVIS P. a ALEXANDER S., 2000. Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. *Human Reproduction*. 15(12), 2621–2633.
- VANDENBERG L. N., COLBORN T., HAYES T. B., HEINDEL J. J., JACOBS D. R., LEE D. H., SHIODA T., SOTO A. M., VOM SAAL F. S., WELSHONS W. V., ZOELLER R. T. a MYERS J. P., 2012. Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews*. 33(3), 378–455.
- VASKIVUO T. E., ANTTONEN M., HERVA R., BILLIG H., DORLAND M., TE VELDE E., STENBÄCK F., HEIKINHEIMO M. a TAPANAINEN J., 2001. Survival of Human Ovarian Follicles from Fetal to Adult Life: Apoptosis, Apoptosis-Related Proteins, and Transcription Factor GATA-4. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 86(7), 3421–3429.
- VERLHAC M. H., DE PENNART H., MARO B., COBB M. H. a CLARKE H. J., 1993. MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. *Developmental Biology*. 158(2), 330–340.
- VILLA-DIAZ L. G. a MIYANO T., 2004. Activation of p38 MAPK during porcine oocyte maturation. *Biology of Reproduction*. 71(2), 691–696.
- VIÑAS R. a WATSON CH. S., 2013a. Bisphenol S Disrupts Estradiol-Induced Nongenomic Signaling in a Rat Pituitary Cell Line: Effects on Cell Functions. *Environmental Health Perspectives*. 121(3), 352–358.
- VIÑAS R. a WATSON CH. S., 2013b. Mixtures of xenoestrogens disrupt estradiol-induced non-genomic signaling and downstream functions in pituitary cells. *Environmental Health*. 12(1), 26.
- VITKU J., SOSVOROVA L., CHLUPACOVA T., HAMPL R., HILL M., SOBOTKA V., HERACEK J., BICIKOVA M. a STARKA L., 2015. Differences in bisphenol A and estrogen levels in the plasma and seminal plasma of men with different degrees of infertility. *Physiological Research*. 64 Suppl 2, S303-311.
- WAN Y., XIA W., YANG S., PAN X., HE Z. a KANNAN K., 2018. Spatial distribution of bisphenol S in surface water and human serum from Yangtze River watershed, China: Implications for exposure through drinking water. *Chemosphere*. 199, 595–602.
- WANG Q. T., PIOTROWSKA K., CIEMERYCH M. A., MILENKOVIC L., SCOTT M. P., DAVIS R. W. a ZERNICKA-GOETZ M., 2004. A Genome-Wide Study of Gene Activity Reveals Developmental Signaling Pathways in the Preimplantation Mouse Embryo. *Developmental Cell*. 6(1), 133–144.
- WANG T., HAN J., DUAN X., XIONG B., CUI X. S., KIM N. H., LIU H. L. a SUN S. CH., 2016. The toxic effects and possible mechanisms of Bisphenol A on oocyte maturation of porcine *in vitro*. *Oncotarget*. 7(22) [vid. 2020-01-22].

- WANG W. H., ABEYDEERA L. R., PRATHER R. S. a DAY B. N., 2000. Polymerization of Nonfilamentous Actin into Microfilaments Is an Important Process for Porcine Oocyte Maturation and Early Embryo Development. *Biology of Reproduction*. 62(5), 1177–1183.
- WEHREND A. a MEINECKE B., 2001a. Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during in vitro maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. *Animal Reproduction Science*. 66(3–4), 175–184.
- WILDING M., DÁLE B., MARINO M., DI MATTEO L., ALVIGGI C., PISATURO M. L., LOMBARDI L. a PLACIDO G. DE, 2001a. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction (Oxford, England)*. 16(5), 909–917.
- WILDING M., DÁLE B., MARINO M., DI MATTEO L., ALVIGGI C., PISATURO M. L., LOMBARDI L. a DE PLACIDO G., 2001b. Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Human Reproduction (Oxford, England)*. 16(5), 909–917.
- YAMAMURO T., KANO K. a NAITO K., 2008. Functions of FZR1 and CDC20, Activators of the Anaphase-Promoting Complex, During Meiotic Maturation of Swine Oocytes. *Biology of Reproduction*. 79(6), 1202–1209.
- YAMASAKI K., NODA S., IMATANAKA N. a YAKABE Y., 2004. Comparative study of the uterotrophic potency of 14 chemicals in a uterotrophic assay and their receptor-binding affinity. *Toxicology Letters*. 146(2), 111–120.
- YAMAZAKI E., YAMASHITA N., TANIYASU S., LAM J., LAM P. K. S., MOON H., JEONG Y., KANNAN P., ACHYUTHAN H., MUNUSWAMY N. a KANNAN K., 2015. Bisphenol A and other bisphenol analogues including BPS and BPF in surface water samples from Japan, China, Korea and India. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 122, 565–572.
- YANG S.-H., LIU R., PEREZ E. J., WEN Y., STEVENS S. M., VALENCIA T., BRUNZINKERNAGEL A.-M., PROKAI L., WILL Y., DYKENS J., KOULEN P. a SIMPKINS J. W., 2004. Mitochondrial localization of estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101(12), 4130–4135.
- YEH S., TSAI M. Y., XU Q., MU X.M., LARDY H., HUANG K. E., LIN H., YEH S. D., ALTUWAIJRI S., ZHOU X., XING L., BOYCE B. F., HUNG M. CH., ZHANG S., GAN L. a CHANG CH., 2002. Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: An in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99(21), 13498.
- YOULE R. J. a VAN DER BLIEK A. M., 2012. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science (New York, N.Y.)*. 337(6098), 1062–1065.
- YU Y., CUI Y., NIEDERNHOFER L. J. a WANG Y., 2016. Occurrence, Biological Consequences, and Human Health Relevance of Oxidative Stress-Induced DNA Damage. *Chemical research in toxicology*. 29(12), 2008–2039.

ZHANG M., BENER M. B., JIANG Z., WANG T., ESENCAN E., SCOTT III R., HORVATH T. a SELI E., 2019. Mitofusin 1 is required for female fertility and to maintain ovarian follicular reserve. *Cell Death & Disease*. 10(8), 560.

ZHANG M., SU Y. Q., SUGIURA K., WIGGLESWORTH K., XIA G. a EPPIG J. J., 2011. Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes in vitro. *Endocrinology*. 152(11), 4377–4385.

ZHAO Kun., KUPERMAN L., GEIMONEN E. a ANDERSEN J., 1996. Progesterone Represses Human Connexin43 Gene Expression Similarly in Primary Cultures of Myometrial and Uterine Leiomyoma Cells. *Biology of Reproduction*. 54(3), 607–615.

ZUCCOTTI M., PICCINELLI A., GIORGI ROSSI P., GARAGNA S. a REDI C. A., 1995. Chromatin organization during mouse oocyte growth. *Molecular Reproduction and Development*. 41(4), 479–485.

ŽALMANOVÁ T., HOŠKOVÁ K., NEVORAL J., ADÁMKOVÁ K., KOTT T., ŠULC M., KOTÍKOVÁ Z., PROKEŠOVÁ Š., JÍLEK F., KRÁLÍČKOVÁ M. a PETR J., 2017. Bisphenol S negatively affects the meiotic maturation of pig oocytes. *Scientific Reports*. 7(1), 485.